



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Obstetricia y Ginecología

**RELACIÓN ENTRE LA INCORPORACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE
SELECCIÓN ESPERMÁTICA CON COLUMNAS DE ANEXINA (MACS) EN
LA MUESTRA SEMINAL Y LOS RESULTADOS EN LOS TRATAMIENTOS
DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA**

SILVIA LOBO GARCÍA

TESIS DOCTORAL

MADRID, 2017



RELACIÓN ENTRE LA INCORPORACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE SELECCIÓN ESPERMÁTICA CON COLUMNAS DE ANEXINA (MACS) EN LA MUESTRA SEMINAL Y LOS RESULTADOS EN LOS TRATAMIENTOS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

Tesis Doctoral presentada por la licenciada Silvia Lobo García para optar al grado de
DOCTOR

Directores:

PROF: Dr. José Manuel Bajo Arenas

Catedrático de Ginecología y Obstetricia

Universidad Autónoma de Madrid

Dr. Vicente Badajoz Liébana

Coordinador del Laboratorio Fecundación *In Vitro*

Ginefiv, S.L.

Madrid, 2017



Madrid, a 10 de Mayo de 2017

Vicente Badajoz Liébana, Licenciado en Biología, Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid, y Coordinador del Laboratorio de Fecundación *In Vitro* de Ginefiv y **Prof. D. José Manuel Bajo Arenas**, Catedrático de Ginecología y Obstetricia de la Universidad Autónoma de Madrid.

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo titulado “RELACIÓN ENTRE LA INCORPORACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE SELECCIÓN ESPERMÁTICA CON COLUMNAS DE ANEXINA (MACS) EN LA MUESTRA SEMINAL Y LOS RESULTADOS EN LOS TRATAMIENTOS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA” ha sido realizado por Dña. Silvia Lobo García bajo su dirección y se encuentra en condiciones de ser leído y defendido como Tesis para alcanzar el grado de Doctor ante el Tribunal correspondiente en la Universidad Autónoma de Madrid.

Dr. Vicente Badajoz Liébana

Prof. D. José Manuel Bajo Arenas

A mis padres, mi hermana, Luis y mis hijos...

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Manuel Bajo Arenas, por invitarme en su día a conocer el apasionante mundo de la reproducción asistida y permitirme desarrollar mi carrera profesional en este área biosanitaria. Gracias por esta oportunidad y por estar siempre ahí.

Al Dr. Vicente Badajoz Liébana, compañero y sobre todo amigo, que siempre me ha apoyado, ayudado y sobre todo acompañado en todos los momentos, mejores y peores, de mi vida profesional.

A la Dra. Victoria Verdú Merino, por ser mi punto de referencia, a la que siempre puedes llamar y contar con ella, sea la hora que sea y el día que sea.

A todos mis compañeros de Ginefiv, por su profesionalidad, dedicación y entrega, ellos hacen que el trabajo diario de sus frutos y podamos ayudar a muchas mujeres y parejas a que su sueño de ser padres se haga realidad. En especial al departamento de Atención al Paciente y al de Genética por enseñarme a diario tantas cosas y por ayudarme siempre que lo he necesitado.

A Amparo de la Puerta Quesada, mi hermana de Madrid, siempre disponible, siempre pendiente, siempre bondadosa, siempre con un sí a todo. Gracias por la gran ayuda incondicional que me has prestado.

A mis padres y mi hermana, que aún estando a muchos kilómetros de distancia siempre están muy cerca.

A mi marido y mis hijos, por estar siempre ahí, ayudarme y quererme tanto. No puedo tener una familia mejor. Gracias por todo.

Contenido

I.	INTRODUCCIÓN.....	15
II.	HIPÓTESIS Y OBJETIVO.....	31
III.	MATERIAL Y MÉTODOS	35
A.	Equipos y materiales utilizados.....	35
1.	Equipos utilizados en el laboratorio de Andrología:	35
2.	Equipos utilizados en el laboratorio de embriología	36
3.	Equipos utilizados en la consulta de Ginecología:	37
4.	Equipos utilizados en la zona de quirófano:.....	38
B.	Diseño del estudio	38
C.	Estudio básico de la infertilidad masculina.....	39
1.	Concentración espermática	40
2.	Movilidad espermática.....	41
3.	Morfología espermática	42
4.	Diagnóstico de las muestras seminales.....	42
D.	Fragmentación del ADN espermático	44
E.	Selección de los donantes de semen.....	46
F.	Selección de las donantes de óvulos	47
G.	Receptora de ovocitos	48
H.	Preparación y sincronización donante-receptora	49
I.	Recuperación ovocitaria tras punción transvaginal de la donante.....	50
J.	Valoración ovocitaria.....	51
K.	Preparación espermática para llevar a cabo la IMSI	53
1.	Capacitación seminal de muestra en fresco.	53
2.	Capacitación espermática de muestras de semen criopreservadas	55
L.	Selección morfológica de espermatozoides (IMSI)	56

M.	Realización de la microinyección espermática de los ovocitos tras la selección espermática final (ICSI).....	58
N.	Valoración de la fecundación	63
O.	Clasificación embrionaria.....	64
P.	Transferencia embrionaria intrauterina	67
Q.	Detección de embarazo	69
R.	Organización de los grupos de estudio en ciclos de recepción ovocitaria con IMSI	70
S.	Estudio estadístico.....	71
IV.	RESULTADOS	75
A.	Descripción de los casos estudiados	75
B.	Estudio comparativo general SI MACS / NO MACS en la selección espermática	75
1.	Grupo de muestras en fresco: SI MACS / NO MACS.....	82
2.	Grupo de muestras congeladas: SI MACS / NO MACS	91
3.	Grupo de muestras de semen de donante: SI MACS / NO MACS ..	99
C.	Gráficas	102
V.	DISCUSIÓN.....	109
VI.	CONCLUSIONES.....	121
VII.	ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....	125
VIII.	BIBLIOGRAFÍA.....	131

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

La infertilidad es un problema creciente en la sociedad actual, la prevalencia de la infertilidad se sitúa en torno al 14%, esto supone que aproximadamente una de cada siete parejas en edad reproductiva presentará problemas para tener descendencia [1]. En el mundo más de 70 millones de parejas sufren problemas de infertilidad [2] y alrededor de un millón de parejas demandan técnicas de reproducción asistida (TRA) en nuestro país, esto sitúa a España en el tercer puesto, detrás de Francia y Alemania, en tratamientos realizados dentro del continente europeo [3].

El retraso en la decisión de tener hijos por motivos económicos-sociales es uno de los motivos por el cual ha aumentado la demanda de las TRA en mujeres mayores de 35 años en los países desarrollados [4]. Hoy en día las mujeres mayores de 35-40 años se ven y se sienten jóvenes, esto junto con la búsqueda del equilibrio económico y laboral, hace que comiencen su proyecto reproductivo más tarde, incita además a todo esto, el mito de que “se puede tener todo” y rara vez piensan en los resultados y riesgos que puede tener una reproducción a una edad materna avanzada.

Los especialistas en medicina reproductiva y ginecólogos obstetras, deben promover una visión más realista y educar a la población en que existe un peligro real de no tener hijos genéticamente propios si optan por retrasar su reproducción [5].

Esto afecta indiscutiblemente de manera directa a la calidad del material biológico recuperado en el caso de la mujer pero las repercusiones sociales también afectan directamente a la calidad seminal del varón, es por ello que vamos a realizar este trabajo en ciclos de ovodonación, cuya edad de las donantes de ovocitos siempre es menor de 35 años y así no nos influye el factor femenino en los resultados. Si que tendremos en cuenta la edad reproductiva masculina.

El factor masculino es una de las causas que afectan con mayor frecuencia al éxito de las TRA, tanto en la fecundación ovocitaria, como en la calidad embrionaria. Del total de las parejas que acuden a un centro de reproducción asistida aproximadamente el 85% de los varones presentan alguna alteración en los

INTRODUCCIÓN

parámetros seminales, aunque sean alteraciones leves en el volumen seminal, la concentración, movilidad o morfología espermática [6].

La calidad del semen empleado en TRA ha pasado a considerarse uno de los factores determinantes en el éxito de estas técnicas [7]. Actualmente, la aplicación de metodologías de rutina para la preparación de las muestras seminales constituye una herramienta básica dentro de los procedimientos incluidos en TRA [8]. El análisis básico del semen o seminograma, es el más relevante de los métodos usados para evaluar a priori la infertilidad debida a un factor masculino, este estudio de la muestra espermática realizado mediante microscopía óptica, está basada en la evaluación de diferentes parámetros como la concentración, movilidad y morfología, entre otros parámetros seminales, con el fin de diagnosticar alguna alteración en los varones infértiles.

Estos parámetros cumplen con los criterios de referencia establecidos por la OMS en el año 2010 [9], pero determinados pacientes teniendo estos parámetros anteriormente mencionados normales, presentan una inexplicable infertilidad y necesitan por tanto, un estudio más riguroso [10]. Por lo que estos análisis rutinarios podrían considerarse a día de hoy como pobres indicadores del potencial de fertilidad masculina [11].

Los diferentes tratamientos de reproducción asistida han ayudado, a lo largo de muchos años, a muchas parejas y mujeres a poder conseguir un embarazo y experimentar la maternidad y paternidad. Con el objetivo de reducir los problemas de esterilidad, en la actualidad contamos con un abanico de técnicas de reproducción asistida (TRA), que suponen para muchas parejas la única opción para tener un niño nacido vivo.

Entendemos por TRA al conjunto de métodos biomédicos que ayudaran a facilitar o sustituir a los procesos biológicos naturales que se desarrollan durante la procreación humana [12].

Cuando ambos gametos, espermatozoide y óvulo, proceden de la pareja que se somete a la técnica hablamos de TRA homólogas y cuando uno de los gametos o ambos proceden de donantes ajenos a la pareja hablamos de TRA heterólogas [12].

INTRODUCCIÓN

Existen distintas técnicas para ayudar a que se de la fecundación (unión del gameto y el espermatozoide).

La Inseminación Artificial (IA) consiste en depositar la muestra de semen en la cavidad uterina de la paciente en el momento más cercano posible a la ovulación, para ello, se realiza una sincronización con visualización ecográfica del crecimiento y desarrollo folicular, ya sea de manera natural o con una estimulación ovárica ayudada de medicación [13][14][15].

De manera no oficial se habla de inseminaciones artificiales en la época del rey Enrique IV (el apodado “El estéril”), existe además documentación de inseminaciones artificiales en animales en los siglos XVIII y XIX pero la primera referencia de inseminación artificial en humanos es la reportada por Guttmacher (1943), Stoughton (1948) y Kohlberg (1953). Sería el comienzo real de la nueva era en la reproducción asistida. Es en este año, 1953, cuando se produce el primer embarazo tras una IA con espermatozoide congelado. Teniendo en cuenta todas estas novedades se podía esperar que en 1970 se hiciera muy popular el denominado “banco de semen” y se comenzara a comercializar, especialmente en Estados Unidos [16].

La fecundación In Vitro (FIV) es una técnica un poco más compleja, consiste en poner en contacto los gametos femeninos y masculinos en el laboratorio, para ello se realiza primero la extracción de los ovocitos a través de la punción ovárica transvaginal de los folículos maduros, previamente estimulados para ello.

Los primeros intentos de fecundación In Vitro (FIV) con óvulos de mamífero fueron llevados a cabo en 1880 por parte del embriólogo Schenk [17]. Tras varios estudios con animales en granjas, no fue hasta a partir de 1930 cuando aparecen los primeros trabajos realizados por Pincus y Enzmann de FIV y transferencia embrionaria en conejos, resultando el primer nacimiento [18]. Estos dos científicos sentaron las bases del proceso de maduración y fecundación de óvulos en mamíferos, pero fueron Pincus y su colaboradora Saunders en 1939 los que aplicaron estos estudios en ovocitos humanos [19].

Tras las primeras ideas en 1955 de Shettles y Rock de extraer los ovocitos por laparoscopia y luego fecundarlos in vitro e introducirlos de nuevo al útero [20], después

INTRODUCCIÓN

de varios estudios de los primeros tratamientos hormonales de estimulación ovárica para la maduración de los ovocitos y de los primeros trabajos en los que ya se observaban las primeras fases de fecundación del ovocito [21] e incluso el primer blastocisto humano observado in vitro, sería en 1978 cuando los trabajos realizados por Edwards y Steptoe se vieron culminados con el nacimiento del primer ser humano mediante FIV (Louis Brown), trabajo que se publicó en la revista “The Lancet” [22].

Esta unión de los gametos de manera extracorpórea (FIV), en el laboratorio se puede realizar de manera convencional poniendo los óvulos con la muestra de semen previamente procesada en el laboratorio y esperar a que se produzca la entrada de un espermatozoide al interior del óvulo [23] o bien a través de la denominada microinyección espermática o ICSI (del inglés Intracytoplasmic sperm injection), esta técnica consiste en introducir un espermatozoide, previamente inmovilizado y aspirado con una micropipeta dentro de un óvulo libre de células de la granulosa. De esta manera, se consigue la unión de los dos gametos, eliminando así los primeros pasos del proceso biológico de la fecundación [24][25].

El desarrollo de la ICSI surgió en la década de los 80, gracias al desarrollo de numerosos métodos de micromanipulación en la industria pecuaria para conseguir la unión de gametos. El primer nacimiento tras ICSI se documentó en conejos [26], siendo la técnica posteriormente aplicada en bovinos [27]. Pero, el primer nacimiento tras ICSI en humanos no llegaría hasta el año 1992 [24].

En un principio, la ICSI se indicó para pacientes con fallos de FIV convencional o cuando la concentración espermática era tan baja que la FIV convencional no podía llevarse a cabo, pero tras haberse probado como un método efectivo para mejorar las probabilidades de embarazo, se convirtió en una técnica de rutina para los laboratorios de embriología [25]. Esta técnica también tiene críticas negativas debidas sobre todo a la micromanipulación humana y por tanto a la existencia de una no selección “natural” que podría no tener en cuenta parámetros seminales como baja movilidad, baja concentración o una mala morfología [28], esto incluso se ha relacionado con una mayor probabilidad de anomalías cromosómicas [29][30].

INTRODUCCIÓN

Dentro de todos estos tratamientos anteriormente citados, es la inyección intracitoplasmática de espermatozoides o microinyección espermática (ICSI) la que se ha convertido en una de las técnicas de reproducción asistida (TRA) de referencia para los laboratorios de embriología. La selección adecuada de los gametos (óvulos y espermatozoides), pero sobre todo la selección espermática, se ha establecido como el mejor criterio para llevar a cabo el proceso de microinyección, y se han reportado bajas tasas de fecundación, implantación, y disminución de la probabilidad de embarazo tras ICSI cuando la calidad espermática presentaba anomalías severas, independientemente de la procedencia de los espermatozoides.

Hasta hace muy pocos años, los microscopios invertidos donde se ha realizado la selección espermática para llevar a cabo la ICSI, estaban acoplados a la óptica de contraste por modulación de Hoffman, según algunos autores, la principal desventaja a la que se enfrenta este sistema de microscopía es el bajo poder de resolución, ofreciendo un máximo de 400 aumentos para valorar ciertas características morfológicas del espermatozoide.

En el año 2002 se desarrolló un nuevo método denominado evaluación de la morfología de los orgánulos de espermatozoides móviles o MSOME (del inglés *motile sperm organelar morphology examination*), que permite visualizar a tiempo real, y sin necesidad de tinción, la morfología espermática de forma más precisa. El MSOME se consiguió acoplando una óptica de contraste de interferencia diferencial de Nomarski a un microscopio invertido. De la unión del MSOME y la ya conocida ICSI surgió la denominada inyección intracitoplasmática de espermatozoides seleccionados morfológicamente o **IMSI** (del inglés *intracytoplasmic morphologically select sperm injection*), por tanto utilizar un microscopio invertido con contraste de interferencia diferencial de Nomarski, usando objetivos de 60x o 100x, parece ser la forma más adecuada para llevar a cabo este tipo de evaluaciones, ya que se pueden conseguir como mínimo entre 900 y 1500 aumentos.

Además del análisis morfológico de los espermatozoides realizado con IMSI, se puede ampliar el estudio y por tanto mejorar dicha selección espermática, existen otros métodos para analizar cromosómicamente a los espermatozoides, métodos para medir la integridad del ADN espermático y estudiar así su impacto en la fertilización,

INTRODUCCIÓN

evolución embrionaria y en las tasas de embarazo. El único inconveniente es que las muestras analizadas tanto para ver las anomalías cromosómicas como la integridad del ADN espermático no podrían ser las mismas muestras a utilizar en la IMSI.

Desde 1980 se ha utilizado una amplia gama de diferentes métodos de separación y selección de espermatozoides móviles [8].

El método más clásico y utilizado para la separación de espermatozoides se denomina Swim-up, originalmente descrito por Mahadevan y Baker [31]. Su fundamento se basa en el movimiento activo de los espermatozoides desde el *pellet* celular al sobrenadante [32]. El *Swim-up* es considerada la técnica más fisiológica para la separación de espermatozoides y resulta adecuado para muestras con buenos parámetros seminales.

Sin embargo, el rendimiento de este método se ve comprometido por la superposición de capas celulares presentes en el *pellet* del centrifugado, pudiendo desplazar a los espermatozoides con mayor movilidad al fondo del tubo. También se ha demostrado una disminución significativa en el porcentaje de espermatozoides con una cromatina normal condensada tras la práctica de este procedimiento. Otra desventaja importante del *Swim-up* es el estrecho contacto que alcanzan los espermatozoides en el proceso de sedimentación con el resto de células y leucocitos, responsables de la alta producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Estas sustancias son capaces de alterar los ácidos grasos poliinsaturados presentes en las membranas plasmáticas de los espermatozoides, originando peroxidación lipídica, lo que se traduce en una disminución de la movilidad espermática [33].

Otra técnica ampliamente utilizada para la separación de espermatozoides es la Centrifugación en Gradientes de Densidad (DGC). Se trata de un método menos fisiológico que el anterior, adecuado para muestras con bajos parámetros seminales, presentando buenos resultados en muestras pobres o congeladas. Los gradientes de densidad son capaces de disgregar y distribuir de manera diferencial los distintos componentes de las muestras seminales en función de su densidad. De esta forma, tras la centrifugación, los espermatozoides con mejor movilidad y morfología, más

INTRODUCCIÓN

compactados y, en consecuencia, más densos, atravesarán los gradientes hasta alcanzar el fondo del tubo constituyendo el sedimento. Así el plasma seminal permanecerá flotando sobre el gradiente de menor densidad y el resto de constituyentes, como los espermatozoides inmaduros y muertos, los leucocitos y las toxinas solubles, se situarán en la interfase entre ambos gradientes [8].

A pesar de que estas técnicas convencionales aportan considerable información sobre las características de las muestras y resultan en la selección de un número suficiente de espermatozoides móviles, fenómenos moleculares como la apoptosis espermática no son evaluados mediante estos procedimientos, pudiendo ser este fenómeno parcialmente responsable de las bajas tasas de fecundación y de implantación en reproducción asistida [34].

Este hecho, junto al incremento de la demanda de las TRA, ha propiciado el desarrollo y uso de técnicas complementarias en los procedimientos de rutina que garanticen un rendimiento óptimo en la separación de espermatozoides funcionalmente competentes para fines de fecundación.

El término "muerte celular programada" fue utilizado originalmente por *Lockshin y Williams* en 1964 para describir una serie de eventos programados que conducían a la eliminación de células durante el desarrollo del organismo. Más tarde, en 1972, *Kerr* y su grupo [35] acuñaron el término "apoptosis" al conjunto de alteraciones celulares morfológicas y bioquímicas que suponían la muerte de la célula.

Este fenómeno juega un papel importante en el desarrollo y homeostasis de los organismos multicelulares, actuando como un mecanismo de defensa mediante la eliminación de células no deseadas o potencialmente peligrosas para el organismo [36].

La apoptosis o muerte celular programada puede originarse en respuesta a estímulos específicos, tales como la privación de factores de supervivencia, la exposición a la radiación ionizante y a agentes quimioterapéuticos, la activación por diversos factores de muerte celular o bien ser inducida como consecuencia de una lesión o estrés celular. Cada vez es más reconocida la relación existente entre este tipo de muerte celular fisiológica y la patogénesis de diversas enfermedades humanas

INTRODUCCIÓN

incluyendo cáncer, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, trastornos neurodegenerativos, aterosclerosis o miocardiopatía [37][38].

El proceso de apoptosis comprende una serie de cambios morfológicos y bioquímicos bien definidos, entre los que se incluyen una contracción y consecuente reducción del volumen celular, vesiculación, condensación de la cromatina y creación de cuerpos apoptóticos.

Por su parte, la necrosis, es un proceso pasivo que no requiere gasto energético de la célula y que se produce en respuesta a una amplia variedad de agentes nocivos.

Durante la necrosis, las células se hinchan y se lisan, liberando el contenido celular, afectando, de esta forma, a las células contiguas y desencadenándose, finalmente, una respuesta inflamatoria [39]. Sin embargo, en la apoptosis las células muertas son rápidamente fagocitadas, impidiendo la lisis celular y, en consecuencia, una reacción inflamatoria (Figura 1).

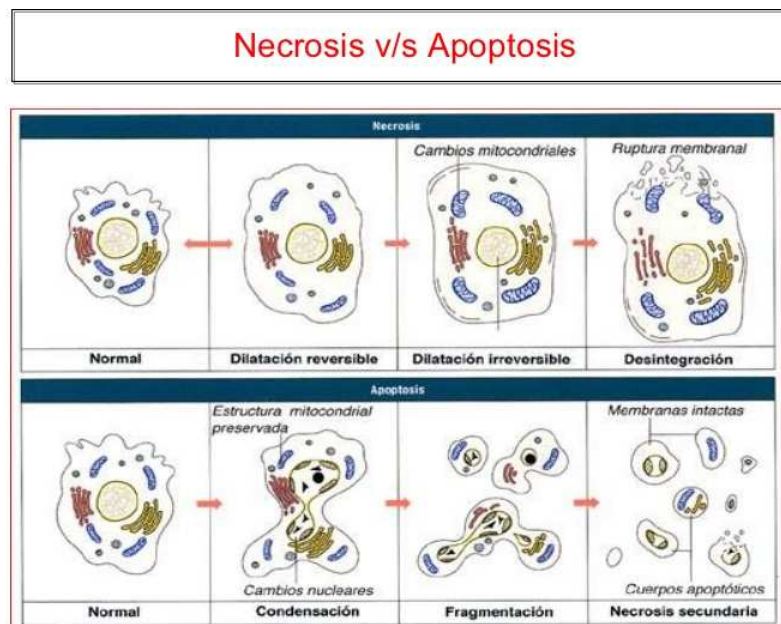


Figura 1. Cambios celulares durante los dos tipos de muerte celular. En la apoptosis tiene lugar un proceso de retracción celular, vesiculación y creación de cuerpos apoptóticos. En este tipo de muerte celular, la célula es rápidamente fagocitada, impidiendo la liberación de su contenido celular. En la

INTRODUCCIÓN

necrosis, la célula sufre un aumento de volumen, terminando por lizar y liberar el contenido celular, provocando inflamación (modificado de Tang y cols., 2012) [40].

Durante las primeras etapas de la apoptosis, las células sufren un proceso de asimetría en sus membranas y de cambios en su composición lipídica, caracterizada principalmente por la externalización de la fosfatidilserina (PS). La exposición de este fosfolípido de carga molecular negativa, desde su ubicación normal, en la cara citosólica de las membranas de las células sanas, a su superficie exterior, ha sido catalogada como una de las primeras características presentes en los espermatozoides humanos apoptóticos [41][42].

La PS tiene una afinidad elevada y selectiva por la Anexina V, una proteína de unión a fosfolípidos dependiente de calcio con un peso molecular de 35-36 kD [43][44].

La Anexina, descubierta inicialmente como una proteína vascular con fuertes propiedades anticoagulantes, no puede atravesar una membrana plasmática intacta, por lo tanto, la unión de esta molécula con la PS sólo ocurre en aquellos espermatozoides apoptóticos, cuya membrana plasmática ha sido alterada, dejando expuesto el fosfolípido en su superficie celular. Esta translocación, junto con la condensación de la cromatina, precede al aumento de la permeabilidad de la membrana y se ha correlacionado negativamente con la movilidad de los espermatozoides [45][46][47]. (Figura 2)

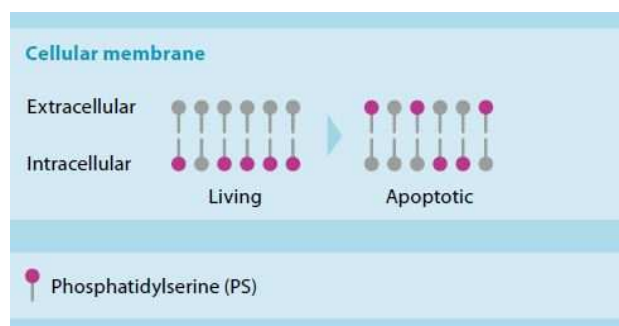


Figura 2. Translocación de PS desde la superficie de la membrana plasmática intracelular a la extracelular durante la apoptosis.

INTRODUCCIÓN

Otro fenómeno que tiene cabida en la apoptosis es la reducción del Potencial de Membrana Mitocondrial (MMP), antes de los cambios nucleares observados en muchas células apoptóticas [48]. Las mitocondrias de los espermatozoides humanos son susceptibles a los estímulos de apoptosis debido a su compartimentalización dentro de la región de la pieza intermedia [49]. Una membrana íntegra y un MMP intacto, es esencial para la movilidad de los espermatozoides y para una fecundación exitosa, puesto que se ha hallado un MMP reducido con mayor frecuencia en los espermatozoides de hombres infértiles [50][51].

Por lo tanto, la alteración del MMP resulta un marcador clave de la cascada de señalización apoptótica y se observa en los espermatozoides humanos después de la crioconservación y descongelación [52][53][54].

Un tercer evento característico de la apoptosis es la activación de las caspasas, una familia de proteasas de cisteína. Estas enzimas participan en una cascada de señalización celular desencadenada en respuesta a señales pro-apoptóticas y que culmina con la proteólisis de las proteínas esenciales para la homeostasis de la célula y, en última instancia, resulta en la muerte celular. Se han encontrado 14 caspasas implicadas en la cascada apoptótica en humanos y su activación se produce por autoproteólisis y/o como resultado de las acciones de otras caspasas o proteínas reguladoras. Una vez activadas, transducen una señal a las caspasas efectoras que conduce a la degradación de sustratos celulares [55][56][57].

La apoptosis o muerte celular programada es un proceso ordenado de muerte de una célula ante estímulos extra o intracelulares. En la *apoptosis extrínseca* o de *tipo I*, la activación de caspasas tiene lugar a través del acoplamiento de ligandos a sus receptores específicos de membrana. Así, el ligando asociado a fibroblastos (*FasL*) es una proteína de transmembrana que tras la unión a su receptor, desencadena un programa intrínseco de muerte celular, lo que conduce a la activación de la Caspasa-8 (CP8) [58][59]. Por su parte, esta caspasa puede iniciar la apoptosis activando directamente a la Caspasa-3 (CP3).

INTRODUCCIÓN

Sin embargo, en la *apoptosis intrínseca* o de *tipo II*, las señales derivadas de la CP8 activan a la Caspasa-9 (CP9) a través de sucesos mitocondriales y ésta, a su vez, activa finalmente a la CP3, responsable última de la condensación de la cromatina y de la generación de roturas en el ADN [60][36] (Figura 3).

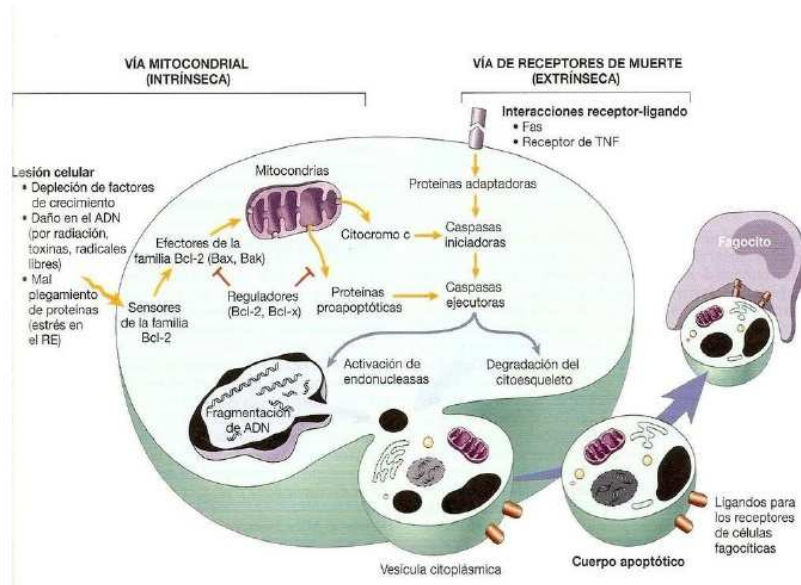


Figura 3. Cascada de apoptosis celular extrínseca e intrínseca. El proceso de apoptosis está controlado por numerosos eventos interconectados. **La vía extrínseca** es activada por señales externas como el ligando de Fas (FasL), que actúa a través de receptores de muerte. En consecuencia, la Caspasa-8 es activada y ejecuta, a su vez, la activación de la Caspasa-3. **La vía intrínseca** es iniciada por diferentes señales, principalmente por estímulos extracelulares. En esta vía, tras la activación de la Caspasa-8, la Caspasa-9 es activada a través de fenómenos mitocondriales, terminando en la activación de la Caspasa-3, principal efectora de la apoptosis (tomado de Bajwa y cols., 2012) [61].

La activación de estas enzimas ha aparecido implicada, no solamente en la alteración de la espermatogénesis, sino también en otras patologías andrológicas, tales como la disminución de la movilidad de los espermatozoides, alta tasa de fragmentación del ADN espermático, torsión testicular, varicocele o infertilidad inmunológica [62]. Este fenómeno se ha descrito como un punto de no retorno bien definido en la progresión de la apoptosis, y una serie de eventos apoptóticos posteriores a la activación de caspasas tiene lugar en la fase tardía del proceso.

INTRODUCCIÓN

La fragmentación de ADN se ha identificado como un evento de apoptosis tardía en espermatozoides de eyaculado humano [47] y ha ido adquiriendo cada vez mayor importancia en el éxito de la reproducción asistida. El daño en el ADN de los espermatozoides puede ser consecuencia de diversos factores, la introducción de un espermatozoide fecundante con su ADN dañado en un ovocito en el proceso de Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI), conlleva un impacto negativo en la viabilidad del embrión y en la salud de la descendencia [63]. El daño del ADN en la línea germinal masculina se asocia con bajas tasas de fecundación, pobre desarrollo embrionario, y altas tasas de aborto involuntario y morbilidad de la descendencia, incluyendo el cáncer infantil [64][65].

Todas estas características apoptóticas descritas se han identificado en espermatozoides del eyaculado, así como en las células germinales intratesticulares [66]. Algunos espermatozoides seleccionados para TRA, podrían mostrar características apoptóticas a pesar de presentar parámetros seminales comprendidos dentro de los valores de normalidad, y esto puede aparecer reflejado en bajas tasas de embarazo, pobre desarrollo embrionario y aborto recurrente [67][68][69].

De toda esta información surge la necesidad de buscar estrategias que permitan reducir el alto porcentaje de espermatozoides apoptóticos con el fin de optimizar los resultados de IMSI. La primera opción en el tratamiento del factor masculino con altos niveles de fragmentación de ADN espermático, es la realización de una biopsia de testículo, puesto que en el epidídimo es donde tiene lugar el mayor daño en el núcleo de los espermatozoides y la omisión del paso de los gametos por dicha vía, permite obtener una menor tasa de fragmentación de ADN espermático [70]. Junto a esto, en los últimos años, también se ha propuesto el uso de antioxidantes orales, previo a la microinyección espermática, para reducir los daños en el material genético de los gametos [71].

El uso de Anexina V acoplada a pequeñas esferas metálicas, de aproximadamente 50 nm de diámetro, y recubiertas por un polímero biodegradable, ha sido empleado por diversos autores para separar espermatozoides apoptóticos [72]. Estas microperlas paramagnéticas conjugadas con Anexina pueden ser usadas para aislar células con externalización de PS y, por tanto, separar espermatozoides con

INTRODUCCIÓN

apoptosis temprana cuando son expuestos a un campo magnético de alto poder en una columna. Este procedimiento de separación o filtrado molecular se denomina **Magnetic-Activated Cell Sorting (MACS)** o **Separación Magnética por Columnas de Anexina V**. Según esta innovadora metodología, las células con externalización de PS (AN+) quedan retenidas en la columna, mientras que aquellas no apoptóticas (AN-) no se adhieren y pasan a través de la columna, siendo las seleccionadas para usar en TRA [73][74][75][76]. Debido al pequeño tamaño de las partículas magnéticas empleadas en esta técnica, se requiere el uso de un potente campo magnético que permita retener las células.

Un sistema particularmente exitoso y diseñado para generar este campo magnético sin afectar a la viabilidad y a la función óptima de las células, es el sistema **MACS® ART MS** (Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach, Alemania). (Figura 4)

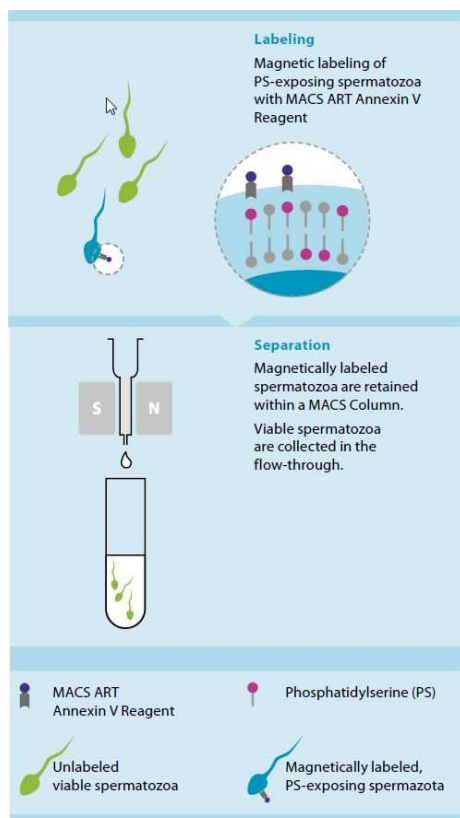


Figura 4. Esquema de una **columna de separación celular magnética MACS® ART MS** (Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach, Alemania). **A)** El campo magnético externo aplicado en las paredes de la columna atrae a las células marcadas magnéticamente mediante la unión de la PS, expuesta en la superficie de las células apoptóticas, y las moléculas de Anexina V acopladas a microesferas magnéticas. **B)** Las células no apoptóticas no quedan retenidas y pasan libremente a través de la columna. **C)** Las células apoptóticas quedan retenidas en el interior de la columna, pudiendo ser recuperadas tras desmontar la columna del campo magnético y posterior elución de la misma (tomado de Said y cols., 2008) [77].

Algunos autores señalan el beneficio de combinar las columnas de Anexina con la técnica clásica de los gradientes de densidad [77][78][79], con el fin de proporcionar a los espermatozoides una mejor calidad en cuanto a términos de movilidad, viabilidad

INTRODUCCIÓN

y apoptosis [74], lo que resultaría importante para lograr unas tasas de concepción óptimas en las TRA [72][80].

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVO

Numerosos estudios clínicos han analizado el impacto en los resultados de las TRA de la utilización de distintos sistemas de separación y selección de gametos masculinos en ciclos de microinyección espermática, valorando las tasas de fecundación, las calidades embrionarias, el embarazo clínico, el aborto y finalmente, el embarazo a término.

La utilización de una selección espermática basada en la morfología de los espermatozoides con una óptica más potente como puede ser la utilizada con la microscopía de Nomarski (IMSI), optimiza dicha selección y por tanto se prevén mejores resultados, pero si además añadimos una selección basada en la viabilidad bioquímica de los espermatozoides a través de la eliminación de la muestra espermática de aquellos espermatozoides destinados a morir, probablemente el pronóstico de los parámetros a estudiar mejorarán.

Los primeros estudios que se realizaron con la utilización de MACS fueron bastante positivos pero a medida que pasa el tiempo y que el uso de la técnica es más frecuente hay estudios con resultados contradictorios, que hacen dudar de la utilización de la técnica MACS, para profundizar más sobre dicha selección espermática, era importante no sesgar el resultado con la calidad ovocitaria, parte importante en los resultados de los parámetros a comparar, debido a esta duda acerca de la utilización de dicha técnica, creí fundamental, realizar este estudio en ciclos de ovodonación para minimizar la influencia de la calidad ovocitaria.

En este estudio pretendo comparar el uso de la combinación de la clásica separación espermática de rutina a través de gradientes de densidad junto con la utilización de columnas de Anexina V, frente al solo uso de los gradientes de densidad como única técnica de selección espermática, previa a la utilización de IMSI en las microinyecciones espermáticas realizadas en tratamientos de recepción ovocitaria (para no sesgar los datos con una indicación ovocitaria de los pacientes) y así valorar, si el intentar reducir el número de espermatozoides apoptóticos (aquellos destinados a morir antes de lograr fecundación) como rutina, nos mejora los distintos parámetros o tasas a valorar, como pueden ser, la tasa de fecundación, las calidades embrionarias,

HIPÓTESIS Y OBJETIVO

la tasa de embarazo clínico, la disminución o no de la tasa de aborto y la tasa de gestación a término.

Mediante un estudio prospectivo no randomizado y utilizando un programa de donación de óvulos a pacientes receptoras, pretendemos:

- Comparar los resultados clínicos obtenidos dependiendo de si se ha utilizado MACS además de IMSI en la muestra, para la selección de los espermatozoides destinados a realizar la microinyección espermática.
- Realizar un análisis de los resultados obtenidos en distintos grupos y/o subgrupos de pacientes, dependiendo del tipo de muestra espermática usada para el proceso de microinyección con IMSI.
- Definir qué tipo de pacientes pueden beneficiarse de la utilización de la técnica MACS tras la separación espermática rutinaria a través de los gradientes de densidad y previo a la realización de IMSI (microinyección en la cual la selección espermática se realiza utilizando microscopía de Nomarski).

MATERIAL Y MÉTODOS

III. MATERIAL Y MÉTODOS

A. Equipos y materiales utilizados

Para llevar a cabo este estudio, se seleccionaron de manera prospectiva y no randomizada, los ciclos de ovodonación con calidades espermáticas N y OAT en los que se usó IMSI en la clínica de reproducción asistida Ginefiv de Madrid, durante el periodo comprendido entre Noviembre 2010 (inicio de la utilización de la técnica MACS en dicho centro) y Noviembre 2014.

Para ello se utilizaron las siguientes infraestructuras y recursos materiales:

1. Equipos utilizados en el laboratorio de Andrología:

- Superficies calefactadas *Hot Plate* 062 (LABOTECH GmbH Labor-Technik, Göttingen, Alemania). Se utilizaron para mantener las muestras espermáticas 37°C.
- Dos campanas de flujo laminar horizontal TELSTAR V-100 (TELSTAR Grupo, Barcelona) con microscopio invertido NIKON TMS-F (NIKON Corp., Japón). En esta zona se realizó la valoración espermática y el procesado de muestras seminales.
- Tres centrifugas KUBOTA 2420 (KUBOTA Corp., Japón). Se utilizaron para la capacitación y lavado de las muestras espermáticas.
- Banco de N₂ líquido ARPEGE 170 (AIR LIQUIDE Medicinal S.L., Madrid). Donde se almacenaron las muestras criopreservadas de los pacientes y donantes de semen.
- Microscopio de campo claro LEICA DMS 750 (LEICA Microsystems, Alemania). Se utilizó para la visualización de la morfología espermática.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Contador de células LEUCOFORM (CRISON Instruments, S.A., Barcelona). Se usó para el recuento de espermatozoides durante el conteo de la morfología espermática.
- Nevera THERMOLABIL (LIEBHERR, Alemania) para el mantenimiento de medios de cultivo y crioprotectores.
- Pipetas automáticas de distinto calibrado (GILSON, Francia; EPPENDORF, Alemania).
- Columna de Anexina V, *MACS® ART MS (Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach, Alemania))*.

2. Equipos utilizados en el laboratorio de embriología

- Cuatro campanas flujo laminar con superficie calefactada y sistema de CO₂ (K-SYSTEMS Kivex Biotec. Ltd., Noruega) acopladas a un microscopio estereoscópico Nikon (Nikon Corp., Japón). Esta zona fue destinada a la manipulación de gametos, embriones y preparación de las placas de cultivo.
- Incubadoras C-200 (LABOTECH, Alemania). Se utilizaron para la incubación de muestras espermáticas, óvulos y el cultivo de los embriones.
- Cinco incubadoras G185 *Long term flat bed* (K-SYSTEMS Kivex Biotec Ltd., Noruega). Se destinaron a la incubación de ovocitos y cultivo de embriones hasta el estadio de blastocisto. El propio incubador lleva integrado un mezclador de CO₂ y N₂ con un suministro conectado de dichos gases.
- Tres microscopios invertidos Nikon TE 2000S y Nikon Eclipse Ti (NIKON Corp., Japón) con superficie calefactada (Tokai *Hit Thermo Plate*, OLYMPUS Corp., Japón) acoplados a microinyectores Narishige (NARISHIGE Corp., Japón), donde se realizó la selección e ICSI.
- Sistema de microscopía de contraste de fases por interferencia diferencial de Nomarski y selector de aumento 1.5x acoplado al invertido Nikon Eclipse

MATERIAL Y MÉTODOS

Ti. Esta óptica de contraste se utilizó para seleccionar los espermatozoides a 900 aumentos.

- Microscopio invertido DIAPHOT 200 (NIKON Corp., Japón) con superficie calefactada (Tokai *Hit Thermo Plate*, OLYMPUS Corp., Japón). Se utilizó para la valoración morfológica de óvulos y embriones.
- Pipetas automáticas de distinto calibrado (GILSON, Francia; EPPENDORF, Alemania).
- Controladores de temperatura y concentración de CO₂ (LABOTECT GmbH Labor-Technik, Göttingen, Alemania). Se utilizaron para realizar el control diario de las temperaturas y CO₂ de las incubadoras.
- Torres con filtros CODA (GEN X International, América) para la filtración de posibles compuestos volátiles en el área del laboratorio.
- Banco de vapores de nitrógeno líquido CBS V1500-AB *Isothermal Freezer* (CUSTOM BIOGENIC SYSTEMS®, MI, U.S.A.). Donde se almacenaron todos los embriones criopreservados.

3. Equipos utilizados en la consulta de Ginecología:

Para la realización de las ecografías en la consulta se utilizaron los siguientes ecógrafos:

- TOSHIBA SSA-530 (TOSHIBA Medical Systems S.A., Madrid).
- TOSHIBA ISTYLE NEMIO XG USDF-580A (TOSHIBA Medical Systems S.A., Madrid).
- GENERAL ELECTRIC LOGIQ F6 (GE Healthcare, Alemania).

Todos ellos contaban con sonda transvaginal y abdominal. Se utilizaron para el control ecográfico del ciclo de receptoras y donantes, y para el seguimiento del embarazo: visualización de saco gestacional (SG) y latido cardíaco fetal (LCF).

MATERIAL Y MÉTODOS

4. Equipos utilizados en la zona de quirófano:

- Ecógrafo TOSHIBA SSA-530 (TOSHIBA Corp., Japón) con sonda transvaginal y abdominal acoplado a una bomba de vacío (LABOTECT 4014, Gmbh Labor-Technik, Göttingen, Alemania) con una aguja de punción 7G (LABOTECT Gmbh Labor-Technik, Göttingen, Alemania). Se utilizó para realizar las punciones ováricas y/o transferencias embrionarias.
- Ecógrafo ALOKA SSD-1700 (HITACHI Medical Systems Europe Holding AG, Suiza) acoplado a sonda abdominal. Se utilizó para hacer transferencias embrionarias.
- Estación de anestesia FABIUS TIRO (DRÄGUER Medical Hispania S.A., Madrid). Se utilizó para la monitorización anestésica de las pacientes durante la punción ovárica.
- Monitor de constantes SIEMENS SC-6002XL.
- Aspirador de secreciones NEW HOSPIVAC 400.
- Superficie calefactada (Hot Plate 062, LABOTECT Gmbh Labor-Technik, Göttingen, Alemania). Utilizada en quirófano para mantener los tubos con los líquidos foliculares a 37°C antes de pasarlos al laboratorio de FIV.
- Autoclave STURDY SA-230 FA (STURDY Industrial Steam Co., Ltd. Taiwán). Se utilizó para autoclavar todo el instrumental de acero inoxidable del laboratorio y quirófano.

B. Diseño del estudio

Se seleccionaron de manera prospectiva y no randomizada, los ciclos de ovodonación en los que se usó IMSI (microscopía de Nomarski) en la clínica Ginefiv, durante el periodo comprendido entre Noviembre 2010 (inicio de la utilización de la técnica MACS en dicho centro) y Noviembre 2014.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se excluyó de dicho estudio aquellos ciclos en los que se obtuvieron menos de 7 ovocitos de la donante (incluidas las cancelaciones de ciclos ya comenzados), los ciclos en los que se realizó fecundación mixta (mitad con semen de donante y mitad con semen de la pareja), ciclos en los que se tuvo que realizar PCR previa a las muestras antes de ser utilizadas, aquellos ciclos en los que la muestra procedía de TESE y ciclos cuya transferencia embrionaria no fuese realizada en día +3 excepto para el cálculo de la tasa de fecundación y calidades embrionarias. Solo se seleccionaron los ciclos con diagnóstico de muestra espermática previa con Normozoospermia (N) y Oligoastenoteratozoospermia (OAT).

El resultado de dicha selección fue de 1.887 ciclos de IMSI. Entre todos ellos, se realizó técnica MACS en 479 ciclos y no se realizó técnica MACS en 1.408 ciclos.

IMSI	SI MACS	NO MACS
1.887 ciclos	479 ciclos	1.408 ciclos

C. Estudio básico de la infertilidad masculina

Antes de la utilización de cualquier muestra espermática, esta debe haber sido analizada previamente mediante un análisis de los parámetros más elementales, con un seminograma, y preparada o capacitada. Este capacitado consiste en la selección de aquellos espermatozoides de mejor movilidad mediante la eliminación del plasma seminal, espermatozoides inmóviles, células inmaduras..., con este proceso se facilita la capacidad de fecundar del espermatozoide, modificando su movimiento en zig-zag y de esta manera facilitarle el acceso al complejo cúmulo-corona del ovocito [81].

Para la realización del estudio o seminograma, las muestras fueron recogidas, mediante masturbación, en un recipiente de orina estéril de propileno de boca ancha, en un plazo máximo de 1 hora hasta la entrada en el laboratorio de andrología y a una temperatura corporal, para ello el paciente habrá mantenido una abstinencia sexual de entre 2 y 5 días de media. En todos los casos se confirmó con ellos que la muestra obtenida era completa, es decir, no había caído nada fuera del recipiente estéril y que los pacientes no habían sufrido procesos febriles ni patologías que les hubieran hecho

MATERIAL Y MÉTODOS

tomar algún medicamento en los últimos 7 días anteriores a la obtención de la muestra.

Una vez llega la muestra al laboratorio de andrología es debidamente identificada, marcada y registrada con los datos personales, datos de entrada y DNI del paciente, dicha muestra se depositará sobre una placa calefactada (Hot-Plate, Labotect) a 37°C, durante 15-30 minutos a la espera de su licuefacción, ya que al estar recientemente obtenida presenta viscosidad, el licuado se comprueba visualizando la muestra, comprobando que presenta un estado homogéneo, sin grumos ni coágulos. El estudio de la muestra se realiza en cabina de flujo laminar horizontal siempre y a temperatura ambiente.

En el estudio macroscópico de la muestra valoramos el olor, aspecto y volumen, para ello nos ayudamos de jeringas graduadas de 10ml, de aspirador mecánico Falcon y de tiras reactivas para la medición del PH (MERCK, Darmstadt, Alemania) con límites de sensibilidad de 6,5 a 10,0.

En el estudio microscópico valoramos la concentración, movilidad, morfología y número de leucocitos por campo, además parte de la muestra permanecerá en el envase estéril, que se mantendrá durante 24h para observar si existe contaminación bacteriana en dicha muestra.

1. Concentración espermática

Para la evaluación de la concentración y movilidad espermática, se depositó una gota de 10 µl de semen en una cámara *Makler*[®] (*Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel*) y se observó bajo el microscopio óptico invertido a 20X aumentos. La cámara *Makler*[®] (*Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel*) consta de una cuadrícula de 10 µm de profundidad y con una superficie de 1 mm² subdividida en 100 cuadros (10 filas x 10 columnas) de 0,01 mm² cada uno. De este modo, la concentración de espermatozoides/ml en las muestras se obtuvo al multiplicar el resultado promedio de tres filas o columnas por el factor 10⁶/ml. (Figura 5)

MATERIAL Y MÉTODOS

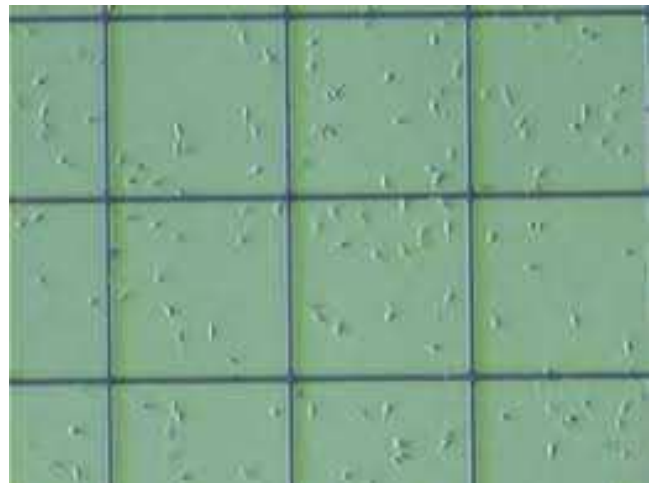


Figura 5: Cámara Makler para la determinación de la concentración espermática. El número de espermatozoides móviles en 10 cuadrados de la cámara determina los millones/ml de la muestra.

2. Movilidad espermática

Por otro lado se depositaron otros 15 μ l de muestra en un portaobjeto y se depositó sobre este, un cubreobjetos de 24 mm x 24 mm, para que mediante contraste de fases y con objetivo de 40x, se valorara la presencia de leucocitos por cada campo y de otras células como las de descamación. También se valorará el tipo de movimiento, desplazamiento y velocidad de los espermatozoides para su clasificación según la OMS [9].

- **Móviles progresivos (A + B):** espermatozoides moviéndose activamente, ya sea de forma lineal o en un círculo grande, independientemente de la velocidad.
- **Móviles no progresivos (C):** todos los otros patrones de movilidad con ausencia de progresión.
- **Inmóviles (D):** no hay movimiento.

Finalmente, entre 5-15 μ l de la muestra fueron reservados a la extensión sobre portaobjetos, para su posterior tinción y valoración de la morfología espermática.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. Morfología espermática

Sobre el portaobjetos limpio con Etanol 70° se dispuso la microgota de muestra y ayudándonos con otro porta se realizó la extensión. La tinción se realizó siguiendo el protocolo de la tinción de Wright, con reactivos Panreac Applychem (Panreac Química S.L.U.). Tras 20 minutos en la solución fijadora (Etanol 90°), se pasó por Eosina, 5 minutos, y por Azur B, 2 minutos. El proceso terminó aclarando el portaobjetos con agua destilada y dejándolo secar. La morfología se valoró en 100 espermatozoides con el objetivo de 100x. Se llevó a cabo el conteo de espermatozoides normales para clasificar la muestra según los datos de la OMS 2010 [9]. (Figura 6)

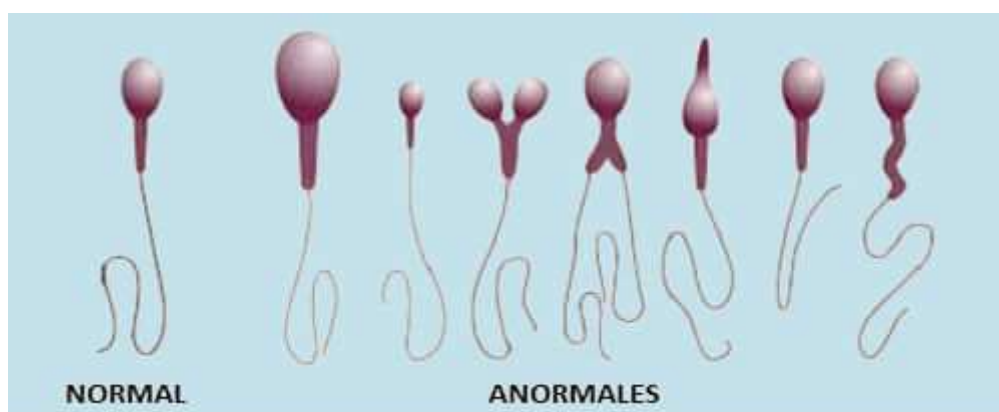


Figura 6: Anomalías morfológicas de los espermatozoides

Tras el análisis de estos parámetros, el resto de la muestra que quedó en el recipiente estéril se mantuvo 24 horas en el laboratorio para el consiguiente estudio de contaminación bacteriana en plasma seminal. En el caso de existir contaminación seminal, se realizó cultivo seminal con antibiograma y si dio positivo para algún microorganismo patógeno, el paciente fue tratado con el tratamiento antibiótico adecuado, posteriormente, se volvió a repetir seminograma dando el visto bueno para iniciar el ciclo de recepción ovocitaria y utilizar una muestra seminal del paciente una vez que el cultivo seminal diera negativo.

4. Diagnóstico de las muestras seminales

Con todos los datos obtenidos del análisis realizado a la muestra de semen se establece un diagnóstico de la muestra siguiendo los valores de referencia que

MATERIAL Y MÉTODOS

establece la OMS [9], que ha establecido una serie de parámetros cuyo análisis rutinario es fundamental en un laboratorio de andrología, a la vez que proporciona una descripción detallada de los métodos y sus limitaciones.

Entre estos parámetros podemos destacar aquellos de análisis macroscópico, como el estudio del volumen de eyaculado, pH, color y apariencia, viscosidad y aquellos de estudio microscópico como concentración espermática, motilidad, vitalidad y morfología.

Para todas estas características se han establecido unos valores umbrales, tanto para el estudio cualitativo como para el cuantitativo, que nos permiten estimar si una muestra entra dentro de los valores de la normalidad o puede considerarse patológica. Esto nos ayuda a tomar decisiones a la hora de llevar a cabo una u otra técnica de selección espermática a la hora de realizar el tratamiento de reproducción asistida.

A pesar de ello, ninguno de estos parámetros puede ser considerado de valor diagnóstico absoluto y es necesaria la combinación de todos ellos para poder llegar a una conclusión. (Tabla 1-2)

PARÁMETRO SEMINAL	LÍMITE DE REFERENCIA INFERIOR
Licuefacción (minutos)	Total a los 60 min
Viscosidad (formación de hilos, cm)	<2
pH	?7,2
Volumen seminal (ml)	1,5 (1,4-1,7)
Número de espermatozoides total (10^6 /eyaculado)	39 (33-46)
Concentración espermática (10^6 /ml)	15 (12-16)
Movilidad total (A+B+C, %)	40 (38-42)
Movilidad progresiva (A+B, %)	32 (31-34)
Vitalidad (espermatozoides vivos, %)	58 (55-63)
Morfología (formas normales, %)	4 (3-4)
Peroxidasa-Leucocitos (10^6 /ml)	< 1
MAR-Test (espermatozoides móviles con partículas unidas, %)	< 50
Test inmunológico (espermatozoides móviles con partículas unidas, %)	< 50
Zinc (μ mol/eyaculado)	? 2.4
Fructosa (μ mol/eyaculado)	? 13
Glucosidasa neutral (mU/eyaculado)	? 20

Tabla 1. Valores del Límite de Referencia Inferior (LRI) contemplados en el manual de la OMS 2010 [9].

MATERIAL Y MÉTODOS

PATOLOGÍA SEMINAL	DESCRIPCIÓN
Aspermia	Ausencia de semen (o eyaculación retrógrada)
Astenozoospermia	Porcentaje de movilidad progresiva por debajo del LRI
Asteneratozoospermia	Porcentajes de movilidad progresiva y morfología normal por debajo del LRI
Azoospermia	Ausencia de espermatozoides en el eyaculado
Criptozoospermia	Espermatozoides no observados en el eyaculado en fresco, pero sí en el pellet tras el centrifugado
Hematospermia	Presencia de eritrocitos en el eyaculado
Leucocitospermia	Presencia de leucocitos en el eyaculado por encima del LRI
Necrozoospermia	Bajo porcentaje de espermatozoides vivos y alto porcentaje de espermatozoides inmóviles en el eyaculado
Normozoospermia	Número total de espermatozoides y porcentajes de movilidad progresiva y morfología normal igual o por encima del LRI
Oligoastenozoospermia	Número total de espermatozoides y porcentaje de movilidad progresiva por debajo del LRI
Oligoasteneratozoospermia	Número total de espermatozoides y porcentajes de movilidad progresiva y morfología normal por debajo del LRI
Oligoteratozoospermia	Número total de espermatozoides y porcentaje de morfología normal por debajo del LRI
Oligozoospermia	Número total de espermatozoides por debajo del LRI
Teratozoospermia	Porcentaje de morfología normal por debajo del LRI

Tabla 2. Denominación y descripción de patologías seminales según el manual de la OMS 2010 [9].

D. Fragmentación del ADN espermático

La fragmentación del DNA espermático se define como la presencia de interrupciones en el DNA, presentes en cadena simple o cadena doble. Ésta se presenta frecuentemente en pacientes con problemas de fertilidad, y se ha comprobado que la proporción de DNA fragmentado en los espermatozoides es superior en pacientes infértiles que en varones con fertilidad probada. Además, se ha encontrado en pacientes cuyo seminograma está alterado, mayor porcentaje de daño en el DNA que en aquellos pacientes con un seminograma normal [82]. La fragmentación es algo común, que se presenta frecuentemente en los varones en mayor o menor proporción. Dependiendo del porcentaje en el que se presente, dará lugar o no a problemas en la fertilidad.

En nuestro centro la valoración de la fragmentación del DNA espermático en las muestras de este estudio, la hemos realizado mediante la técnica SCD (*Sperm Chromatine Dispersion*), para ello se ha utilizado el Kit Halosperm® de Halotech DNA®,

MATERIAL Y MÉTODOS

de observación fácil de llevar a cabo por un técnico previamente preparado, ya que la imagen que produce es clara en la mayoría de los casos. Además, sólo requiere un microscopio de campo claro en su modalidad más sencilla.

Para este análisis la muestra se habrá recogido en recipiente estéril de propileno de boca ancha y el paciente habrá mantenido una abstinencia de eyaculado de entre 1-2 días. Una vez la muestra espermática es depositada en el laboratorio de andrología, bien identificada y marcada, se deja en la placa calefactada a la espera de su licuefacción, una vez licuada y en la cabina, tras todas las comprobaciones, se inicia el proceso antes de que hayan transcurrido 30 minutos y si es necesario forzar la licuefacción, nos ayudaremos de pipeta pasteur o de medios como la tripsina, hasta que veamos que la viscosidad es la adecuada para el análisis.

Se toman 15 µl de muestra y se depositan en una cámara Makler® (Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel) para valorar con el objetivo de 10x el recuento de espermatozoides, se cargan otros 15 µl de muestra y se depositan en un portaobjetos con un cubreobjetos de 24x24 mm y con el objetivo de 40x se valora la movilidad, avance y velocidad de los espermatozoides. Tras estas valoraciones tomamos una alícuota que contenga entre 10-20 millones de espermatozoides por mililitro, la colocamos en un tubo eppendorf bien identificado y marcado y se procede a su congelación para su posterior análisis.

Una vez descongelada a temperatura ambiente, la muestra fue diluida con G-IVF plus™ (VITROLIFE) hasta conseguir una concentración final de 5-10 millones/ml. Después se homogeneizó 40-45 µl de la muestra con agarosa. Un volumen de 15 µl de la mezcla anterior se dispuso sobre un portaobjetos pretratado con agarosa y se extendió con la ayuda de un cubreobjetos. Se deposita sobre una placa metálica en nevera y aproximadamente a los 10 minutos, cuando la muestra ha gelificado a 4°C se retira el cubreobjetos.

El portaobjetos se introdujo, siguiendo este orden, 7 minutos en solución desnaturalizante, 25 minutos en solución de lisis y 5 minutos en agua destilada. La deshidratación se hizo con Etanol de menor a mayor concentración (70, 90 y 100%) permaneciendo 2 minutos en cada concentración. Para la tinción se utilizó solución de

MATERIAL Y MÉTODOS

Wright con reactivos PANREAC APPLICHEM (Panreac Química S.L.U.) durante 7-10 minutos. Tras el secado, se procedió a la observación de la muestra bajo el microscopio con el objetivo 100x y se contaron 500 espermatozoides por muestra.

Tras el tratamiento, la cromatina espermática forma una serie de halos alrededor de la cabeza del espermatozoide. Aquellos que presenten fragmentación en su DNA no son capaces de formar bucles de DNA, observándose halos muy reducidos o ausentes. Por el contrario, los espermatozoides cuyo DNA esté intacto y no presenten fragmentación, mostrarán halos de gran tamaño alrededor de la cabeza del espermatozoide [83]. Analizando el tamaño de los halos podemos determinar la proporción de fragmentación en la muestra de espermatozoides o índice de fragmentación (IF) [84]. Cuando el daño del DNA es mayor al 30% se supone que el potencial de fecundación disminuye. (*Figura 7*).

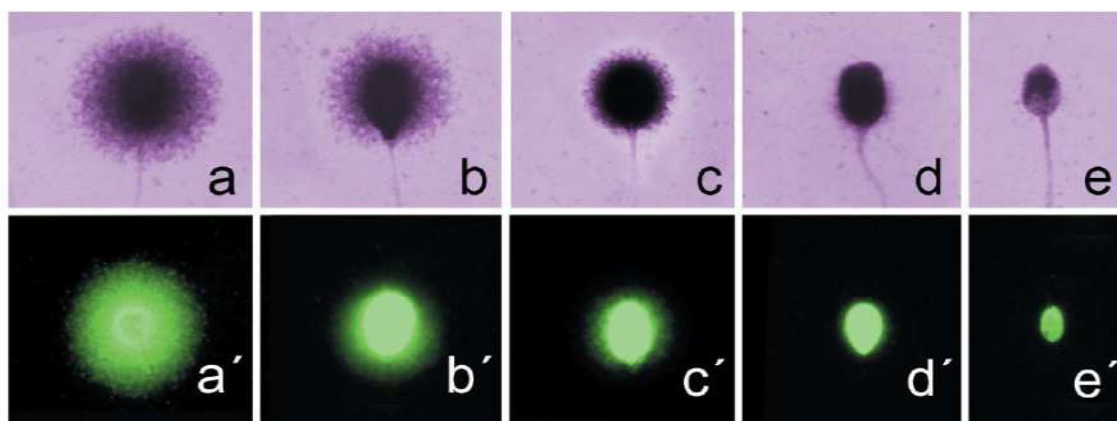


Figura 7: Visualización de la integridad del DNA mediante el test SCD (Sperm Chromatin Dispersion) y visualización en microscopía de campo claro (a-e; tinción: colorante de Wright) y microscopía de fluorescencia (a'-e': tinción SYBR-Green). Mientras que los espermatozoides etiquetados como a y b, tienen su DNA integro, el resto presentan DNA fragmentado [83].

E. Selección de los donantes de semen

La selección y aceptación de donantes en nuestro centro se hizo siguiendo el marco jurídico regulador de la reproducción asistida en España, que está constituido actualmente por la Ley 14/2006 del 26 de Mayo. Siguiendo esta ley, todas las donaciones fueron anónimas y no lucrativas y siempre acompañado por

MATERIAL Y MÉTODOS

consentimiento informado del proceso, firmado por el candidato a donante. Se seleccionaron donantes menores de 30 años (edad límite de aceptación de donantes de semen en nuestro centro), con un estado psicofísico adecuado y con menos de 6 hijos nacidos vivos en España. Durante el estudio de aceptación, se valoró que el donante tuviera plena capacidad de obrar, buenos hábitos (consulta con psicología y realización de test psicológico para descartar patologías psicológicas más frecuentes) y compatibilidad y similitud, inmunológica y fenotípica (raza, peso, talla, textura de pelo y color de ojos), con la pareja de la mujer receptora.

A los donantes de semen se les evaluó el historial reproductivo, se les realizó anamnesis para descartar enfermedades importantes y hereditarias en la familia, para ello además, se le realizó un cariotipo en sangre periférica y estudio de las 50 mutaciones más frecuentes de la fibrosis quística, pidiendo consentimiento informado según lo dispuesto en la ley 14/2007 de investigación biomédica, para eludir posibles desordenes genéticos. Además, se realizaron serologías para descartar presencia de enfermedades infecciosas transmisibles.

Para comprobar que los donantes no tienen las muestras espermáticas alteradas se les realiza, un seminograma para verificar que se trata de muestras normozoospermicas (N), cultivo seminal y de orina, y una prueba de congelación y descongelación a cada una de las muestras espermáticas para asegurarnos que el día que necesitemos una muestra en concreto, va a tener una óptima descongelación y va a poder ser usada sin ningún problema.

Una vez aceptado el donante, se depositan las muestras en los bancos de donación a la espera de ser utilizado según necesidad de características fenotípicas y sanguíneas de los pacientes y siempre cumpliendo el periodo ventana de tiempo de las serologías antes de su utilización.

F. Selección de las donantes de óvulos

La selección y aceptación de las donantes de óvulos en nuestro centro se hizo, al igual que con los donantes de semen, siguiendo el marco jurídico regulador de la reproducción asistida en España, que está constituido actualmente por la Ley 14/2006

MATERIAL Y MÉTODOS

del 26 de Mayo. Siguiendo esta ley, todas las donaciones fueron anónimas y no lucrativas.

Se seleccionaron donantes mayores de edad que no superasen los 35 años, con un estado psicofísico adecuado y con menos de 6 hijos nacidos vivos en España. Durante el estudio de aceptación, se valoró que la donante tuviera plena capacidad de obrar, buenos hábitos (consulta con psicología y realización de test psicológico para descartar patologías psicológicas más frecuentes) y compatibilidad y similitud, inmunológica y fenotípica (raza, peso, talla, textura de pelo y color de ojos), con la mujer receptora. Se evaluó su historia reproductiva (embarazos, abortos, hijos nacidos).

Se le realizó un cultivo endocervical de Chlamydias y Gonococo, y una citología cervicovaginal. Tras realizar anamnesis clínica para intentar evitar el posible riesgo de transmisión de enfermedades hereditarias, se les realizó un cariotipo en sangre periférica y estudio de las 50 mutaciones más frecuentes de la fibrosis quística, pidiendo consentimiento informado según lo dispuesto en la ley 14/2007 de investigación biomédica, para eludir posibles desordenes genéticos. Además, se realizaron serologías para descartar presencia de enfermedades infecciosas transmisibles y resto de parámetros sanguíneos, hormonales y bioquímicos.

Para poder admitirlas como donantes en nuestro centro además deben tener al menos un número mínimo apropiado de folículos antrales al realizarles una ecografía con sonda transvaginal.

Las donantes que cumplieron todos los requisitos y aceptaron bajo consentimiento informado la donación de óvulos para una paciente receptora (en el marco de la Ley 14/2006), fueron informadas de los riesgos de la administración de la medicación, de la posibilidad de hiperestimulación ovárica y de la intervención o punción folicular (extracción de los ovocitos).

G. Receptora de ovocitos

Las principales indicaciones para ser receptoras de óvulos fueron: menopausia, fallo ovárico precoz, fallo ovárico por quimioterapia o radioterapia, ser portadoras de

MATERIAL Y MÉTODOS

alteraciones genéticas o tener disgenesias gonadales, haber sufrido fallos repetidos de FIV por causa ovocitaria, por factor etario o baja respuesta y/o ovarios inaccesibles.

A todas las receptoras se les explicó, mediante consentimiento informado, la técnica de fecundación *in vitro* con óvulos de donante. Se les informo de cuando estaba indicada dicha técnica, así como del procedimiento, los resultados y los riesgos.

Siguiendo los aspectos legales en el marco jurídico de la Ley 14/2006 sobre técnicas de reproducción asistida, se les informó del procedimiento con donantes, su selección por parte del equipo médico y los contratos regulados por la SEF de dicha donación, la determinación legal de la filiación, la premoriencia del marido y la crioconservación de gametos y preembriones.

H. Preparación y sincronización donante-receptora

La estimulación ovárica de las donantes de óvulos se realizó mediante un ciclo corto con la ayuda de antagonistas de hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), bien ORGALUTRAN® 0,25 µg (MSD) o CETROTIDE® 0,25 µg (Merck-Serono) y un anticonceptivo previo, al inicio del ciclo, tomado al menos durante 14 días. La medicación utilizada para la estimulación fue FSHr (GONAL® (Serono) ó PUREGON® (MSD) a dosis moderadas, entre 100 UI-225 UI diarias durante una media de 10-12 días.

La punción ovárica se programó con la visualización de al menos 3 folículos superiores a 17mm, administrando un bolo de análogos de GnRH, DECAPEPTYL® (Ipsen Pharma) 0.2 mg, 36 horas previas como triggering para inducir la ovulación.

La preparación endometrial de las pacientes receptoras se realizó mediante ciclo sustitutivo administrando estrógenos: PROGYNOVA® (Bayer) o MERIESTRA® (Novartis) por vía oral a dosis entre 4-8mg/día o bien ESTRADERM MX® (Novartis) por vía transdérmica a dosis de 50-150mg/3 días, y si fue necesario se les realizó una supresión hipofisaria previa mediante anticonceptivos orales en pauta continua, o análogos de la hormona liberadora de gonadotropina, DECAPEPTYL® (Ipsen Pharma) 3,75 mg, única dosis en la fase lútea, alrededor del día 21 del ciclo previo.

MATERIAL Y MÉTODOS

El día de la punción ovárica de la donante, la receptora comenzó con una suplementación de gestágenos o apoyo en fase lútea, en forma de progesterona natural micronizada, PROGEFFIK® (EFFIK) o UTROGESTÁN® (SEID), a dosis de 600-800 mg/día por vía vaginal.

Confirmada la gestación, la administración de estrógenos y progesterona se mantuvo hasta un tiempo aproximado de 70 días (8ª-10ª semana de gestación), tiempo en el que la ginecóloga considera que ya no es necesaria dicha suplementación, si la receptora tuviese algún tipo de sangrado y por tanto hubiese alguna amenaza de pérdida de la gestación, podrá prolongar en el tiempo la administración de dicha medicación.

El día de la extracción de los óvulos a la donante, una vez extraídos, mientras estos ovocitos son preparados en el laboratorio de embriología, de manera paralela, se preparan los gametos masculinos o espermatozoides en el laboratorio de andrología, para una vez ambos preparados, proceder a la realización de la microinyección de cada óvulo con un espermatozoide seleccionado.

I. Recuperación ovocitaria tras punción transvaginal de la donante

Una vez programada la fecha y hora de la extracción de ovocitos a la donante de óvulos, tras haberle inducido la ovulación unas 36h antes aproximadamente, se procede a la entrada de la donante al área quirúrgica con las comprobaciones de identificación protocolarias y con una serie de confirmaciones previas a la realización de la intervención como puede ser el ayuno total. Esta intervención se realiza siempre bajo supervisión del equipo de anestesistas y con una sedación inconsciente con Propofol (Diprivan®, Aztrazeneca), Fentanilo (Fentanest®, Janssen Farmaceútica), Atropina (Braun) y Metamizol Magnésico (Normon), según peso y necesidades individuales de los pacientes, siempre comprobando la no existencia de alergias medicamentosas a estos principios activos.

La punción es realizada por un ginecólogo especializado, introduciendo una sonda transvaginal con una guía y aguja acoplada a esta, se visualizan los ovarios y

MATERIAL Y MÉTODOS

se van pinchando los folículos y aspirando los líquidos foliculares ayudándonos de una bomba de vacío, puncionando primero un ovario y a continuación el otro.

Los líquidos foliculares quedan recogidos en unos tubos Falcon y pasados al laboratorio de embriología para su comprobación. La donante mientras, permanecerá monitorizada en un box de observación, hasta estar completamente recuperada e informada de las instrucciones y la próxima cita de revisión.

J. Valoración ovocitaria

Una vez en el laboratorio de embriología los líquidos foliculares, y tras todas las comprobaciones identificativas pertinentes, se recogen los cúmulos corona-ovocito (CCCO) en cabina de flujo laminar con superficie calefactada y un sistema de CO₂ acoplado, se reparten dichos líquidos en distintas placas Falcon 100x15mm (Becton Dickison) , y con un estereomicroscopio y ayudados de un sistema de aspiración acoplado a una pipeta Pasteur de 5.75 (Humagen™, Fertility diagnostics), se recogen los CCCO que se mantendrán hasta el proceso de decumulación en placas multipocillos (NUNC™, IVF multidish) con medio de cultivo (G-IVF™ PLUS, Vitrolife) cubierto con aceite de parafina filtrado (OVOIL™, Vitrolife). El cultivo se realizó a 37°C con 6% de CO₂ y 95% de humedad relativa en estufas incubadoras C-200.

La decumulación de los CCCO se realiza en placas NUNC IVF 60x15, usando hialuronidasa (HYASE™-10X VITROLIFE) y medio tamponado (G-MOPS™ PLUS VITROLIFE) en una relación 1:9. Utilizando pipetas pasteur de 5.75, los cúmulos fueron pasados por microgotas de la mezcla hialuronidasa-medio tamponado. Posteriormente, mediante Stripper Tips (Atlantic Diagnostics), de diámetros comprendidos entre los 135 y 150 nm, se procedió a la decumulación en G-MOPS™ PLUS en la misma cabina de flujo laminar.

Tras el proceso de decumulación, los óvulos se pasaron de forma individualizada a placas de microgotas de G-IVF™ PLUS cubiertas con aceite estéril OVOIL™.

MATERIAL Y MÉTODOS

Posteriormente, se procedió a la observación de los óvulos bajo un microscopio invertido para comprobar el estado madurativo de los mismos, para ello hay que valorar su aspecto morfológico y clasificarlos en [85]:

- **Metafase II (MII):** observamos óvulos en segunda división meiótica visualizando corpúsculo polar (CP).
- **Metafase I (MI):** observamos óvulos en primera división meiótica donde no se observa CP.
- **Profase I (PI):** Donde se observa vesícula germinal (VG) correspondiente a dicha fase meiótica.
- **Atrésicos:** Que han sufrido una destrucción espontanea, de aspecto citoplasmático oscuro y alargados [85].



Imagen 1: Visualización de ovocito en Metafase II (MI)



Imagen 2: Visualización de ovocito en Metafase I (MI)



Imagen 3: Visualización de ovocito en Profase I (PI)

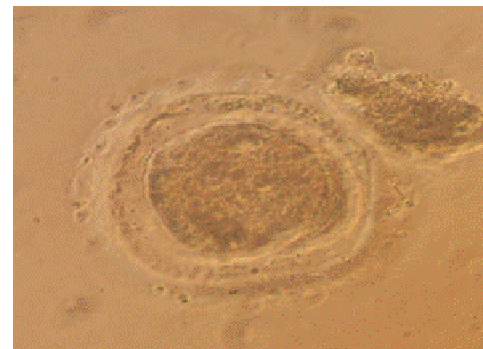


Imagen 4: Visualización de ovocito atrésico.

K. Preparación espermática para llevar a cabo la IMSI

1. Capacitación seminal de muestra en fresco.

Grupo 1: Muestras No MACS

El paciente aporta dicha muestra obtenida preferiblemente por masturbación, con una abstinencia previa de entre 1-5 días, recogiénola en un recipiente estéril, con las manos bien limpias y con un tiempo máximo de una hora desde la obtención de la muestra hasta su llegada al laboratorio. La muestra se entregará siempre a una temperatura corporal.

La muestra de semen es debidamente identificada y marcada con los nombres y los apellidos de ambos miembros de la pareja y número de historia, además estos datos quedan registrados en una hoja de entrada de muestras junto con los DNI y la hora de llegada. La muestra se deposita sobre una placa calefactada (Hot-Plate, Labotect) a 37°C, esperando entre 15-30 minutos aproximadamente para su licuefacción si es recién obtenida ya que casi todas son bastante viscosas. Una vez licuado el semen y calculado el volumen total, se procede a colocar quince microlitros en un porta objetos evaluando en un microscopio invertido (Nikon TMS) su concentración, movilidad y morfología, dando así un diagnóstico que se confirmará con el dado el día que se realizó el estudio o seminograma.

En la mayoría de los laboratorios de FIV se utilizan dos tipos de técnicas, rápidas y sencillas para el capacitado de la muestra espermática:

- **Swin up**, consiste en permitir que sólo los espermatozoides de buena movilidad puedan ascender al sobrenadante [86]. Primero se centrifuga el semen con medio de cultivo G-IVF™ (VITROLIFE, Suecia), se retira el sobrenadante, y al sedimento se le añade con cuidado 0,1-0,3ml de medio de cultivo G-IVF™ (VITROLIFE, Suecia) otra vez y se deja incubar a 37°C y a 5% de CO₂. De esta manera los espermatozoides de mejor movilidad ascenderán y posteriormente se rescatará el sobrenadante.

MATERIAL Y MÉTODOS

- **Gradientes de densidad**, es el método de selección de espermatozoides utilizado en nuestro laboratorio. Los espermatozoides seleccionados tendrán que vencer la dificultad de movimiento en dos gradientes de distinta densidad, uno de 80% y otro de 40%, hasta llegar al fondo del tubo, eliminando de esta manera el plasma seminal, detritus y espermatozoides inmóviles [87].

Utilizando pipetas pasteur estériles (Cotton Plug) se forman los gradientes de densidad en tubos cónicos NUNC® de 10 ml (NUNC® CryoTube® Vials, Dinamarca). El de 80% estará formado por: 8 ml de SPERMGRAD™ (VITROLIFE, Suecia) + 2 ml de G-IVF™ (VITROLIFE, Suecia) y se deposita 0,5 ml de esta mezcla en el fondo del tubo. Sobre este gradiente se deposita muy lentamente 0,5 ml del gradiente de 40% que está formado por: 4 ml de SPERMGRAD™ (VITROLIFE, Suecia) + 6 ml de G-IVF™ (VITROLIFE, Suecia), es importante que se visualicen las dos fases.

Una vez formados ambos gradientes, con mucho cuidado, se deposita 2 ó 3 ml de semen sobre estos, dependiendo de su calidad y se centrifuga a 1000 rpm durante 20 minutos en una centrífuga KUBOTA 2420 (KUBOTA Corp., Japón). Finalizada la centrifugación se accede con mucho cuidado al pellet formado y se recupera aproximadamente 0,2 ml de este pellet. Este volumen se deposita en otro tubo cónico al que se añade 0,8 ml de medio de lavado G-IVF™ (VITROLIFE, Suecia) y, junto con el pellet, se resuspende. De este último tubo se retira aproximadamente 15 µl, para colocarlo en una cámara Makler® (Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel) y así, realizar el conteo y evaluar el movimiento de los espermatozoides capacitados. De esta manera se obtiene la concentración de espermatozoides por mililitro.

Con este último tubo cónico, que contiene 0,2 ml de pellet y 0,8 ml de medio de lavado, se realiza el lavado de semen. Se centrifuga a 1200 rpm durante 5 minutos, finalizado el tiempo se retira el sobrenadante y al pellet se le añade 0,25 ml de medio final G-IVF™ (VITROLIFE, Suecia). Hasta el momento de la microinyección de los ovocitos, que no superará más de una hora de tiempo, la muestra queda depositada en la estufa Labotect C-200 a 37°C, 6% de CO₂ y 95% de humedad, durante este tiempo los mejores espermatozoides realizarán de manera natural swim-up.

MATERIAL Y MÉTODOS

Esta es la capacitación espermática de las muestras del grupo 1 de este estudio, en las que no se lleva a cabo la técnica MACS (NO MACS) después de los gradientes de densidad.

Grupo 2: Muestras Si MACS

A las muestras del grupo 2, antes de pasar las muestras espermáticas capacitadas al laboratorio de embriología para realizar la microinyección a través de IMSI, se les aplicará la técnica MACS de la siguiente manera:

Cogemos el tubo en el que tenemos 0,2 ml de pellet más 0,8 ml de medio de lavado G-IVF™ (VITROLIFE, Suecia), del cual hemos cogido previamente 15 µl para ver concentración en la Makler® (Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel), y a este le añadimos 100 µl de MACS ART *Annexin V reagent*, por cada 10 millones de espermatozoides contados en la Makler® (Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel). Esta mezcla se deja incubar durante 15-20 minutos a temperatura ambiente mientras se prepara la solución buffer de lavado, MACS ART *Binding Buffer*. Cuando queden 1-2 minutos para que acabe la incubación, se procede al lavado de la columna con 0,5ml de la solución buffer al 1x desechando lo obtenido. La muestra espermática incubada se diluye hasta 0,5-1 ml de solución buffer y se pasa por la columna. El filtrado (AN-) se recolecta en un tubo falcon y se puede volver a pasar 0,5 ml de solución buffer para terminar de lavar la columna y así asegurarnos que ningún espermatozoide AN- queda retenido en la columna.

2. Capacitación espermática de muestras de semen criopreservadas

Si la muestra fuese a criopreservarse por algún motivo (stress, viajes, muestras de donantes...), tras el último lavado a 1.200 rpm durante 5 minutos, además de añadirle a la muestra el medio final G-IVF plus™ (Vitrolife, Suecia) habría que añadirle además un criopreservante SPERMFREEZE™ (FERTIPRO, Bélgica), en una proporción 10:7 y tras diez minutos a temperatura ambiente, se procede a su criopreservación en criotubos con vapores de nitrógeno líquido. Una alícuota de la muestra criopreservada fue sometida a una prueba de descongelación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Parte de la muestra se mantiene en el recipiente estéril de recogida durante 24h para observar si hay o no contaminación bacteriana en el plasma seminal y una vez confirmado que la muestra no está contaminada y que la prueba de descongelación ha ido bien, se mantiene criopreservada la muestra hasta el día que se realice la microinyección espermática.

Para la prueba de descongelación ó para descongelar la muestra el día de la punción de la donante, esta se mantuvo a 37°C durante 15 minutos. Para retirar el criopreservante, se realizó un lavado a 1.200 rpm durante 5 minutos. Tras retirar el sobrenadante se añadió sobre el pellet entre 0,1-0,3 ml de G-IVF plus™ (Vitrolife, Suecia). De igual modo, la muestra ya capacitada se mantuvo haciendo *swim-up*, en estufa calefactada a 37°C, hasta el momento de la microinyección, nunca superando el límite de 1 hora.

L. Selección morfológica de espermatozoides (IMSI)

La selección morfológica de espermatozoides tuvo lugar a temperatura ambiente, bajo un microscopio invertido Nikon Eclipse Ti acoplado al sistema de microscopía de contraste de fases por interferencia diferencial de Nomarski y a un selector de aumento 1.5x. Por requerimientos del sistema, las placas usadas fueron placas de Petri de 60x15 mm (NUNC™, Dinamarca), donde se realizaron dos microgotas de 15µl de un medio de alta viscosidad de polyvinylpyrrolidona (PVP) y albúmina humana recombinante (ICSI™ VITROLIFE, Suecia), cubiertas por aceite OVOIL™ y varias microgotas de G-MOPS™ PLUS (VITROLIFE, Suecia).

En una de las microgotas de ICSI™, se dispusieron entre 2-3 µl de la muestra espermática capacitada anteriormente en el laboratorio de andrología, independientemente de pertenecer al grupo 1 (NO MACS) o 2 (SI MACS). La otra quedó libre para preparar la pipeta de ICSI mediante la aspiración de ICSI™, es decir, se realizó el equilibrado de la pipeta. Una vez preparada la pipeta de ICSI y enfocada a 40x se procedió a enfocar la microgota con los espermatozoides. El revólver del objetivo se cambió a 60x cubriéndolo previamente con aceite de inversión y se perfeccionó el enfoque de los espermatozoides bajo la óptica de Nomarski.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para realizar el proceso de forma rápida y limpia, fue muy importante, tener siempre bien centrada y enfocada la pipeta de ICSI así como bajar el revólver antes de cambiar al objetivo de 60x. De esta manera se evitó perder del campo de visión la pipeta de ICSI e incluso romperla, con la consecuente pérdida de tiempo para terminar el proceso. Una vez todo listo y enfocado bajo la óptica de Nomarski, se utilizó un selector de aumento de 1.5x consiguiendo ver los espermatozoides a 900 aumentos. (Imagen 5)(Imagen 6)(Imagen 7).

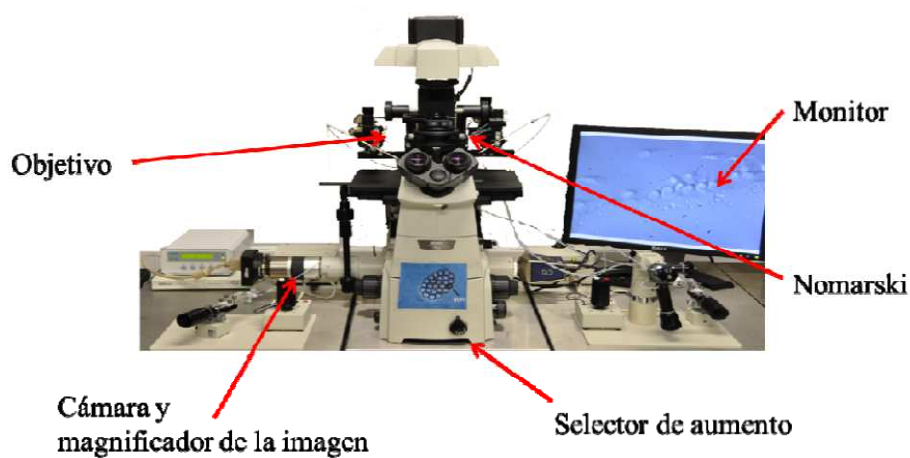


Imagen 5: Microscopio invertido Nikon Eclipse Ti acoplado a la microscopía de contraste de interferencia de Nomarski.

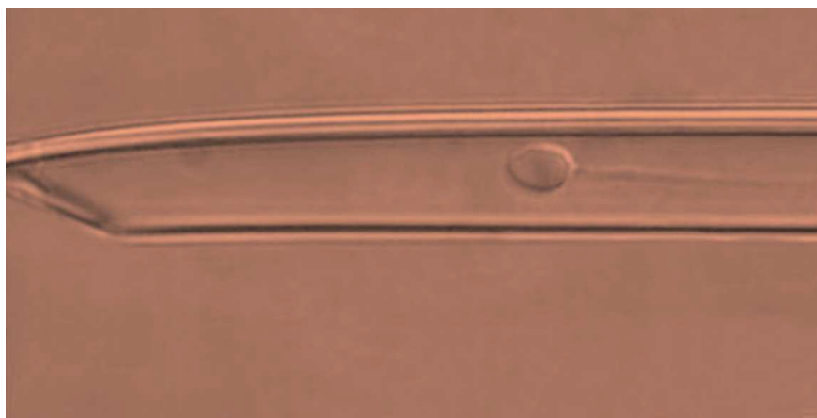


Imagen 6: Aspiración con pipeta de ICSI a 900 aumentos (60x1,5)

MATERIAL Y MÉTODOS

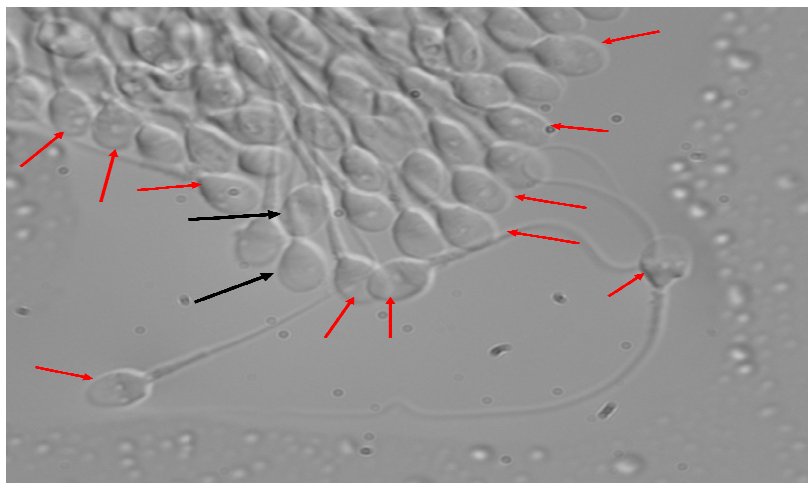


Imagen 7: Visualización de espermatozoides con la óptica de contraste diferencial de interferencia de Nomarski. Espermatozoides con flecha de color negro serían los óptimos a seleccionar para la posterior microinyección, los indicados por la flecha roja no serían óptimos (vacuolas visibles en la cabeza).

Los espermatozoides fueron seleccionados siguiendo los criterios de Bartoov [88], donde se descartaron de la selección aquellos que presentaron más anomalías morfológicas y en particular, mayor porcentaje de vacuolas en el área de la cabeza espermática. Mediante la pipeta de ICSI se fue procediendo a la inmovilización y aspiración de los espermatozoides. Finalmente, los seleccionados para microinyectar se trasladaron con la ayuda de la pipeta de ICSI a una nueva microgota de ICSI™ en una placa de Petri 60x15 mm (NUNC™, Dinamarca) con microgotas de G-MOPS™ PLUS (VITROLIFE, Suecia) cubiertas por OVOIL™. En esta placa se realizó la microinyección.

M. Realización de la microinyección espermática de los ovocitos tras la selección espermática final (ICSI)

Para la microinyección (ICSI) sólo se necesita un espermatozoide móvil por ovocito que se microinyecta, por eso en esta técnica se necesita un número bajo de espermatozoides.

Para la realización de la ICSI, los ovocitos tienen que ser tratados bajo un proceso llamado decumulación ovocitaria, este proceso se realiza entre las 2-4 horas

MATERIAL Y MÉTODOS

posteriores a la extracción de los ovocitos en la punción folicular, dependiendo del grado de inmadurez de estos ovocitos [89].

En este proceso se eliminan mediante un conjunto de métodos enzimáticos y mecánicos las células del cúmulo que los rodea. El objetivo de este proceso fue valorar el grado de madurez ovocitaria y facilitar su manipulación durante la microinyección.

La decumulación de los CCOO se realizó en placas de Petri 60x15 mm (NUNC™, Dinamarca) usando una mezcla de hialuronidasa HYASE™-10X (VITROLIFE, Suecia) y medio tamponado G-MOPS™ PLUS (VITROLIFE, Suecia) en una relación 1:9 y G-MOPS™ PLUS (VITROLIFE, Suecia).

Utilizando pipetas *Pasteur* de 5.75 (HUMAGEN™ Fertility Diagnostics, EEUU), los CCOO fueron pasados por microgotas de la mezcla hialuronidas HYASE™-10X (VITROLIFE, Suecia) y medio tamponado G-MOPS™ PLUS (VITROLIFE, Suecia) para posteriormente dejarlos sobre las microgotas de solo G-MOPS™ PLUS (VITROLIFE, Suecia). Mediante Stripper Tips (ATLANTIC DIAGNOSTICS, América) de diámetros comprendidos entre los 135 y 150 nm, se procedió a la decumulación mecánica de los ovocitos.

Tras el proceso de decumulación, los óvulos se pasaron de forma individualizada a placas de Petri de 60x15 mm (NUNC™, Dinamarca) preparadas con microgotas de G-IVF™ PLUS (VITROLIFE, Suecia) recubiertas con aceite OVOIL™ (VITROLIFE, Suecia) donde se evaluó su estado de madurez bajo un microscopio invertido.

Para llevar a cabo el proceso de la microinyección se tiene que preparar la denominada placa de inyección que consta de:

- Medio PVP (polyvinylpyrrolidona, Vitrolife) donde se inmovilizan los espermatozoides.
- Medio G-MOPS™ PLUS (VITROLIFE, Suecia) donde se realiza la inyección.
- Aceite mineral OVOIL™ (VITROLIFE, Suecia) que cubre las gotas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se colocan seis gotas de medio G-MOPS™ PLUS (VITROLIFE, Suecia), siendo dos de lavado y cuatro de inyección y dos gotas de PVP y se cubre con aceite. El medio PVP es un medio de alta viscosidad e incompresibilidad y es donde se colocan los espermatozoides capacitados y previamente seleccionados por IMSI, de esta manera el movimiento de los espermatozoides se ve ralentizado y es más fácil su manipulación. Una de las gotas de PVP queda limpia y es donde se inmoviliza a los espermatozoides. Para el manejo de los ovocitos y el semen se necesita:

- Micropipeta de ICSI o de inyección (Humagen).
- Micropipeta de Holding o de sujeción (MICROPIPETES HUMAGEN™ Fertility Diagnostics, EEUU).
- Microscopio Nikon eclipse Ti.
- Micromanipuladores Narishinge-Nikon.

Pasos para realizar ICSI:

Antes de comenzar hay que asegurarse de que el aparato de inyección esté en perfecto estado, placa térmica transparente (Tokai Hit) encendida, esta será la superficie donde se colocará la placa de inyección. Los macromanipuladores del inyector deben estar centrados y el sistema de micromanipuladores hidráulicos de la holding y de la inyección deben estar perfectamente cargados de aceite y sin burbujas. Así mismo, el joystick de inyección debe estar centrado.

A continuación se lleva a cabo la colocación de las micropipetas de Holding y de inyección en los lápices unidos al sistema hidráulico, para lo cual se hace rebosar el aceite por estos antes de su colocación.

Se colocan las micropipetas, la de holding a la izquierda y la de inyección a la derecha, perfectamente enfrentadas y horizontales.

La aguja de inyección se coloca sobre una de las gotas PVP en donde se habrán situado previamente los espermatozoides. Se aspira algo de PVP y se dispone a la localización y aspiración de los espermatozoides de mejor aspecto. En la otra gota

MATERIAL Y MÉTODOS

de PVP limpia, se sueltan los espermatozoides y se inmovilizan con la propia micropipeta de inyección, situándose encima del flagelo del espermatozoide y con un ligero toque del joystick se rompe este. De esta manera se están desencadenando reacciones a nivel de membrana del espermatozoide necesarias para la fecundación, que traerán consigo la descondensación de su núcleo, evitando que el espermatozoide rompa las estructuras del ovocito cuando se introduzca artificialmente mediante este proceso [90].

Se aspira el espermatozoide inmovilizado por la cola con la micropipeta de inyección.

En la gota de G-Mops Plus, donde está el ovocito, se realizará la inyección, enfocándolo.

Se baja la pipeta de holding y se aproxima la aguja de inyección. Se sitúan ambas cercanas al ovocito a inyectar.

En este momento se succiona el ovocito con la micropipeta de holding enfocándolo, viendo perfectamente la membrana citoplasmática de este y su zona pelúcida.

A continuación, con ayuda de la micropipeta de inyección, se rota el ovocito hasta colocarlo con su corpúsculo polar en posición adecuada para la inyección, aproximadamente, hacia las seis menos cuarto.

Se comprueba que el ovocito esté bien aspirado y se aproxima la micropipeta de inyección al ovocito con el espermatozoide en la punta de esta.

Se atraviesa el ovocito con la aguja de inyección con mucho cuidado, atravesando en primer lugar la zona pelúcida.

A continuación se atraviesa la membrana plasmática del ovocito, formándose el llamado cono de inyección, tan importante para pronosticar un buen resultado del proceso [91].

MATERIAL Y MÉTODOS

Se aspira citoplasma del ovocito y se pone en contacto con el espermatozoide. En este momento se notará un tirón, indicando que la ruptura ya se ha producido.

Se introduce nuevamente el espermatozoide devolviendo el citoplasma aspirado y procurando no introducir PVP en el interior del ovocito.

Se retira la aguja de inyección y se libera el ovocito de la sujeción de la pipeta de holding.

Se anota como ha ido el proceso de inyección, cual ha sido el comportamiento del ovocito, las características morfológicas más importantes de este y el aspecto morfológico del espermatozoide utilizado en este proceso. (Imagen 8).

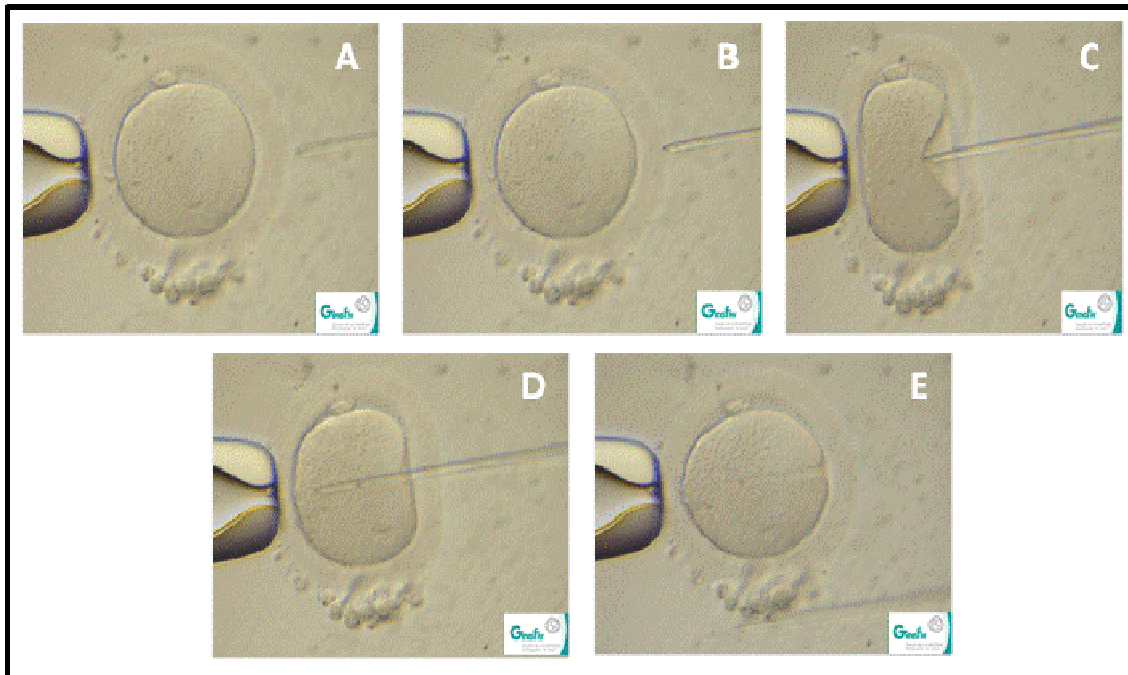


Imagen 8: Proceso de microinyección espermática (ICSI): A: Correcta orientación del ovocito mediante la succión de la micropipeta de Holding (izquierda) y enfoque del espermatozoide dentro de la pipeta de ICSI (derecha). B: Introducción de la pipeta de ICSI a través de la zona pelúcida. C: Introducción de la pipeta en el citoplasma del ovocito. D: Inyección del espermatozoide en el citoplasma. E: Formación del cono de microinyección en el citoplasma del ovocito tras depositar el espermatozoide en su interior.

Una vez realizado el mismo proceso con todos los ovocitos maduros recuperados de la punción folicular, los óvulos microinyectados se cultivaron de forma

MATERIAL Y MÉTODOS

individualizada en placas NUNC IVF 35x10 de microgotas de G-1 TM serie v5 PLUS VITROLIFE, y se mantuvieron en cultivo en las estufas incubadoras a 37°C, 6% de CO₂ y 95% de humedad.

A las dieciocho o veinte horas tras la microinyección se evalúa la fecundación de los ovocitos inyectados.

N. Valoración de la fecundación

A partir de la técnica anteriormente descrita, los siguientes pasos consisten en la generación de embriones que bien serán transferidos al útero de la paciente receptora en día +3 o bien se vitrificarán para un uso posterior. El primero de esos pasos es la evaluación de la correcta fecundación de los ovocitos inyectados. El proceso de fecundación técnicamente se define como la unión de un ovocito con un espermatozoide para dar lugar a una nueva entidad genética. El ovocito se activa dándose tres fenómenos:

- Extrusión del segundo corpúsculo polar
- Formación del pronúcleo femenino
- Descondensación de la cabeza del espermatozoide y posterior formación del pronúcleo masculino.

Ambos pronúcleos se aproximan y se fusionan aumentando previamente de tamaño. En el interior de estos pronúcleos se distinguen los cuerpos pronucleares (CPN). En la especie humana el pronúcleo masculino tiene más cuerpos pronucleares y es mayor que el femenino [92].

En nuestro laboratorio la fecundación o visualización de pronúcleos se realiza de dieciséis a veinte horas tras la inseminación o inyección (día +1 postpunción), identificando como ovocito correctamente fecundado cuando aparecen dos corpúsculos polares y dos pronúcleos. (Imagen 9)

MATERIAL Y MÉTODOS



Imagen 9: Ovocito fecundado, con sus 2PN y sus 2CP

Tras el chequeo de pronúcleos se vuelve a colocar la placa en la estufa a 37°C y 6% CO₂ en la misma posición en la que partió.

Para la clasificación valoraremos el tipo de pronúcleo en función de tamaño, número y posición de cuerpos pronucleares (CPN) [93][94], distinguimos cuatro tipos, según el criterio de clasificación propuesto por Scott y Smith 1998 [95]:

- Z1: En el que hay de tres a siete CPN polarizados, sincrónicos y tres o menos CPN de diferencia entre los dos pronúcleos, con pronúcleos de igual tamaño y juntos. Son los de mejor pronóstico.
- Z2: Cuando se visualizan de siete a diez CPN dispersos y sincrónicos, con pronúcleos de igual tamaño y juntos.
- Z3: Cuando bien uno de los dos pronúcleos o los dos tienen uno o dos CPN, con pronúcleos de igual tamaño y juntos. Uno de los dos pronúcleos tiene los CPN dispersos y otro polarizado, 2PN con CPN asincrónicos.
- Z4: Cuando se da cualquier otra combinación o si se visualizan pronúcleos de distinto tamaño y separados.

O. Clasificación embrionaria

No cabe duda de que el éxito de un tratamiento de fecundación in Vitro recae en el nacimiento de un niño sano.

El laboratorio tiene la misión de seleccionar aquellos embriones que maximicen las posibilidades de embarazo disminuyendo el riesgo de un embarazo múltiple, para

MATERIAL Y MÉTODOS

esto, el embriólogo realiza la observación del material biológico con el que trabaja (muestra de semen, ovocitos recuperados y embriones formados). Es por ello que el objetivo principal del laboratorio de embriología es identificar aquellos embriones con mayor potencial implantatorio, para ello en día +2 de desarrollo, y coincidiendo con las 44 horas post inseminación, se evalúan los embriones, descartándose aquellos que, han parado su desarrollo, que presentan más de dos blastómeras multinucleadas, alto porcentaje de vacuolas y/o alta fragmentación.

El día de la transferencia embrionaria coincidió con el día 3 de desarrollo embrionario, este día se evaluó la calidad embrionaria entre las 67-72 horas post inseminación y se descartaron entonces embriones parados y/o inviables por alta tasa de fragmentación o alto porcentaje de vacuolas. El resto de embriones fue evaluado por el embriólogo, en el laboratorio de embriología, siguiendo las directrices de clasificación embrionaria propuesta por ASEBIR: (Imagen 10)

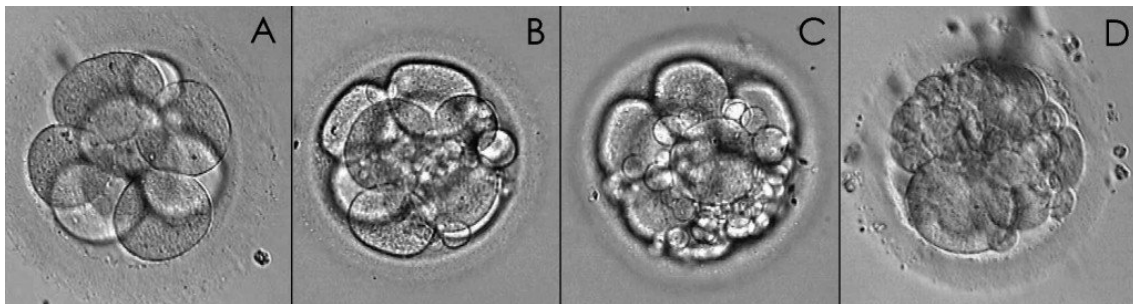


Imagen 10: Clasificación embrionaria en día +3 postinseminación. A) Embrión categoría A, B) Embrión categoría B, C) Embrión categoría C, D) Embrión categoría D.

- Categoría A: Óptima calidad embrionaria y máxima capacidad de implantación.
- Categoría B: Buena calidad embrionaria y elevada capacidad de implantación.
- Categoría C: Embrión de calidad media con una capacidad media de implantación.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Categoría D: Embrión de no muy buena calidad con baja probabilidad de implantación.

La división de los cigotos se evaluó siguiendo en todo momento las pautas de ASEBIR basadas en tres características principales:

- Número de blastómeros y simetría, es decir igualdad o desigualdad entre el tamaño de las distintas células del embrión.
- Ritmo de división y/o evolución del embrión hasta día +2 o de día +2 a día +3 de desarrollo.
- Porcentaje y tipo de fragmentación celular. En un embrión viable el porcentaje de fragmentación total puede variar desde el 0 hasta el 35-40% del volumen total del embrión.

También se valoraron otras características morfológicas, como porcentaje de vacuolas en el embrión, visualización de núcleos celulares y aspecto de la zona pelúcida (membrana que recubre y protege el embrión), haciendo que la calidad embrionaria no solo dependiera de las características principales.

Los embriones con 2 o 4 blastómeros en día +2 que evolucionaron a 7 y 9 células entre las 67-72 horas post microinyección, fueron considerados de calidad A y B aunque además tuvieron que cumplir los requisitos de ser embriones sin blastómeros multinucleados, con bajo o inexistente porcentaje de vacuolas y tener una buena simetría celular y una fragmentación menor del 20% del volumen total del embrión para pertenecer a estas categorías A y B.

MATERIAL Y MÉTODOS

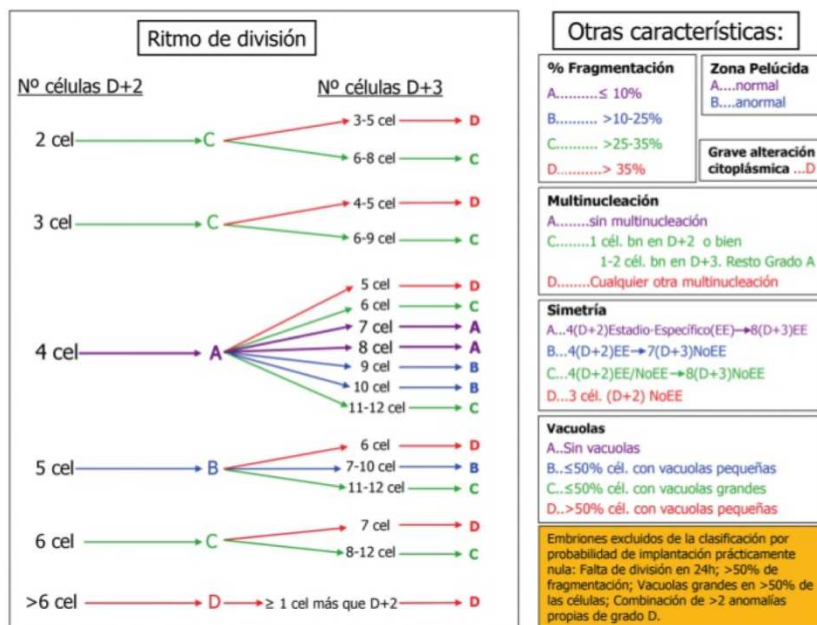


Figura 8: Clasificación embrionaria ASEBIR

P. Transferencia embrionaria intrauterina

Los embriones seleccionados para transferir se cultivaron en una placa de cultivo multipocillos (NUNC™ IVF multidish) con G-2™ v5 PLUS VITROLIFE y en las estufas incubadoras C-200 hasta el momento de la transferencia embrionaria. El resto de los embriones viables fueron criopreservados en nuestro banco de embriones.

La transferencia embrionaria es el proceso mediante el cual se depositan en el útero de la paciente los embriones generados y seleccionados en el laboratorio procedentes de un tratamiento de fecundación in vitro, en este caso realizada dicha fecundación in vitro con IMSI a los gametos de una donante y la transferencia embrionaria se realiza en el útero de la mujer receptora. En este paso es de vital importancia el entendimiento entre el embrión transferido y el endometrio de la paciente, dada nuestra experiencia como centro de reproducción humana, podemos afirmar, que de todos los pasos de la fecundación in vitro la transferencia embrionaria es uno de los más importantes de todos ellos y que una buena práctica y un protocolo estricto de transferencia traerá consigo una mejora en los resultados [96].

MATERIAL Y MÉTODOS

En este paso tan importante se depositan los embriones a través de la vagina, canalizando el cuello uterino con una sonda de transferencia hasta llegar al tercio superior de la cavidad endometrial. Para la correcta realización de la transferencia embrionaria, es de vital importancia que se cumplan de manera correcta los protocolos internos de transferencia por parte del ginecólogo/a y del embriólogo/a [97]. De la buena sincronía entre ellos dos y de sus habilidades dependerá en gran medida el éxito de este proceso tan importante que da por culminado el ciclo de fecundación.

Los pasos descritos a continuación son los utilizados por nuestros embriólogos y ginecólogos:

- El ginecólogo coloca el espéculo estéril en vagina.
- Es necesaria la limpieza de la vagina y exocervix con suero fisiológico y aspiración del moco cervical.
- El ginecólogo canaliza el cérvix con mucho cuidado hasta dentro de la cavidad endometrial con una sonda denominada fiador o vaina de transferencia, que ha sido entregada previamente por el laboratorio.
- En este momento el embriólogo se dispone al cargado de los embriones. La sonda de transferencia se dirige al pocillo donde se encuentran los embriones, cargándose con sumo cuidado y con muy poco medio: 0,01 mililitros. En este momento se han de aplicar unas medidas de control importantísimas para garantizar la correlación entre embriones y paciente, es decir un buen protocolo de identificación. Esta sonda de transferencia es trasladada por el propio embriólogo hasta la sala de transferencia.
- El ginecólogo introduce la sonda hasta aproximadamente 1,5 o 2,5 cm del fondo del útero a través del fiador entregado previamente. Allí se inyectan los embriones lentamente permaneciendo un minuto sin mover la cánula. La paciente tendrá la vejiga llena para una mejor visualización del útero mediante ecografía abdominal ya que nos facilita la introducción del fiador y posterior sonda de transferencia en cuello y útero, ya que, cuando la vejiga

MATERIAL Y MÉTODOS

está llena, modifica la posición habitual de anteflexión del útero y el trayecto del fiador y la sonda es más rectilíneo [98][99].

- Posteriormente el ginecólogo retira la sonda de transferencia lentamente.
- Esta sonda se devuelve al laboratorio y allí se comprueba que no han quedado embriones retenidos en la sonda. Para lo cual simplemente se desacopla la jeringa, se carga aire y se vuelve a acoplar y como previamente se introdujo medio, al presionar, este saldrá arrastrando a los posibles embriones que pudieran haber quedado en ella. Este protocolo de cargado y de comprobación realizado en el laboratorio se hace bajo un estereomicroscopio Nikon SMZ800 en cabina K-Systems.

Todo el proceso ginecológico se realiza bajo control ecográfico abdominal para visualizar el trayecto uterino y localizar la zona endometrial donde se depositan los embriones, esto es posible gracias al uso de catéteres eco-refringentes.

En cuanto al tipo de sonda que utilizamos para la transferencia, en la mayoría de los casos es una sonda blanda, nada dañina al canalizar el fiador a través del cuello del útero, evitando sangrados en su recorrido uterino. Esta sonda es un catéter de transferencia embrionaria Labotec. Para transferencias difíciles, por complicaciones en el cuello del útero o por posición anómala de este, solemos utilizar una sonda de transferencia más rígida (Gynetics Medical Products, Bélgica) [100][101].

Una vez terminado el proceso de la transferencia, la paciente permanecerá en reposo en camilla aproximadamente unos 20 minutos.

Q. Detección de embarazo

En Ginefiv, la comprobación de embarazo la solicitamos quince días después de la realización de la transferencia, mediante una determinación de la subunidad β -hCG en sangre periférica. Por regla general, llegados al día quince la gran mayoría de las pacientes no han sufrido descamación endometrial (debido a la administración de estrógenos y progestágenos que mantienen), pero aun habiendo tenido sangrado les realizamos la β -hCG en sangre.

MATERIAL Y MÉTODOS

Si el resultado es positivo, la paciente receptora seguirá con la misma medicación y se citará en consulta aproximadamente a los 21 días postransferencia para una comprobación ecográfica con sonda transvaginal para confirmar la presencia de saco gestacional intraútero y descartar por tanto la posibilidad de embarazo bioquímico o extrauterino. Una semana más tarde (28-30 días postransferencia) se comprueba ecográficamente si hay latido cardíaco fetal (LCF), una vez confirmado este y si no hay ningún incidente inesperado, el resto del embarazo será llevado por su ginecólogo obstetra habitual.

R. Organización de los grupos de estudio en ciclos de recepción ovocitaria con IMSI

- Grupo SI MACS comparado con grupo NO MACS
- Grupo SI MACS comparado con grupo NO MACS con muestra espermática de la pareja en fresco (MF).
 - ✓ Según calidades espermáticas, N y OAT
 - ✓ Según su fragmentación de ADN espermático, $IF \leq 30$ y $IF > 30$.
 - ✓ Según edad de los varones, ≤ 40 años y > 40 años
 - Tasa fecundación.
 - Número embriones de calidad A+B en día +3.
 - Tasa de embriones de calidad A+B en día +3.
 - Tasa de gestación clínica.
 - Tasa aborto.
 - Tasa de gestación a término.
- Grupo SI MACS comparado con grupo NO MACS con muestra espermática de la pareja criopreservada (MC).
 - ✓ Según calidades espermáticas, N y OAT
 - ✓ En muestras con $IF \leq 30$ (ninguna muestra con $IF > 30$)
 - ✓ Según edad de los varones, ≤ 40 años y > 40 años
 - Tasa fecundación.
 - Número embriones de calidad A+B en día +3.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Tasa de embriones de calidad A+B en día +3.
 - Tasa de gestación clínica.
 - Tasa aborto.
 - Tasa de gestación a término.
- Grupo SI MACS comparado con grupo NO MACS con muestras de semen de donante (SD).
 - Tasa fecundación.
 - Número embriones de calidad A+B en día +3.
 - Tasa de embriones de calidad A+B en día +3.
 - Tasa de gestación clínica.
 - Tasa aborto.
 - Tasa de gestación a término.

S. Estudio estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el programa informático SPSS 23.0 (Chicago, IL). Los datos cuantitativos se expresaron como media \pm desviación estándar y los datos de frecuencia como porcentaje.

La independencia de las muestras analizadas se ha evaluado mediante la prueba no paramétrica “U de Mann-Whitney”, en el caso de datos cuantitativos, y mediante la prueba no paramétrica “Test de Chi cuadrado” (χ^2) para el análisis de frecuencias. En ambos casos se ha considerado significación estadística cuando $p < 0,05$.

RESULTADOS

RESULTADOS

IV. RESULTADOS

A. Descripción de los casos estudiados

Se describieron 1.887 casos que fueron seleccionados para esta investigación, de los cuales, en 1.408 (74.62%) casos no se utilizó la técnica MACS a la hora de la preparación y selección espermática antes de la realización de la IMSI (NO MACS) y otros 479 (25.38%) casos en los que si se utilizó la técnica MACS (SI MACS).

Para hallar la tasa de fecundación tuvimos en cuenta que se inyectaron una media de 10.59 ± 2.70 ovocitos por ciclo o caso y la tasa de fecundación media del total de casos analizados fue de $66.17 \% \pm 18.63$.

El número de embriones obtenidos en día +3 por caso, fue de 4.93 ± 2.22 , de los cuales fueron de categoría A+B un total de 2.63 ± 1.73 embriones por caso o ciclo, es decir un 53.35% de los embriones eran de buena calidad.

El número de embriones transferido por ciclo fue de 1.77 ± 0.50 .

Nº EMBRIONES A+B EN DÍA +3	2.63 ± 1.73
% DE EMBRIONES A+B EN DÍA +3	53.35 %
TASA DE FECUNDACIÓN	66.17%
TASA DE GESTACIÓN CLÍNICA	53.68 %
TASA DE ABORTO	21.33 %
TASA DE GESTACIÓN A TÉRMINO	33.94 %

Muestra poblacional. Variables continuas expresadas en valor MEDIO \pm desviación típica. Variables discretas expresadas en porcentajes (n).

B. Estudio comparativo general SI MACS / NO MACS en la selección espermática

Número de ovocitos inseminados (muestra poblacional):

Nº OVOCITOS INSEMINADOS	
SI MACS	10.34 ± 2.44
NO MACS	10.70 ± 2.78

RESULTADOS

Parámetros a analizar

Número de embriones A+B en día +3:

Nº EMBRIONES A+B EN DÍA +3	
SI MACS (n= 479)	2.51 ± 1.69
NO MACS (n= 1408)	2.67 ± 1.74
p	0.039

El número de embriones calidad A+B en día +3 es significativamente mayor en el caso del grupo NO MACS, aunque al calcular la tasa se iguala más y por tanto la diferencia de las tasas de embriones de calidad A+B en día +3 no es significativa.

Tasa de embriones A+B en día +3:

TASA EMBRIONES A+B DÍA +3	
SI MACS (n=477)	52.09 % ± 26.30
NO MACS (n= 1395)	52.44 % ± 26.40
p	0,815

Tanto el número de embriones calidad A+B en día +3 como la tasa de embriones A+B en día +3 es mayor en el grupo NO MACS.

En cuanto a fecundación observamos que si hay una diferencia significativa clara entre la utilización de MACS y no MACS:

TASA DE FECUNDACIÓN	
SI MACS (n= 479)	0,6929 ± 0.17
NO MACS (n= 1408)	0,6511 ± 0.19
p	0,0005

Vemos que la **tasa de fecundación** comparando los dos grupos de forma general es más alta en el grupo SI MACS.

En cuanto a la **tasa de gestación clínica**, tomaremos como tal, el porcentaje de casos con β -HCG positiva, siendo este valor de β -HCG ≥ 5 mUI/mL en el día 15 postransferencia embrionaria:

RESULTADOS

TASA GESTACIÓN CLÍNICA	n GESTACIÓN	n NO GESTACIÓN	% GESTACIÓN
SI MACS (n= 384)	217	167	56,51%
NO MACS (n= 1263)	634	629	50.20%
p	0,03		

Vemos que la tasa de gestación en día +15 postranferencia es mayor en el grupo SI MACS y además con una diferencia significativa.

Para hallar la **tasa de aborto**, partimos de que del total de casos β -HCG +, no en todos se llegó a visualizar saco gestacional o latido cardiaco fetal positivo para poder considerarlo como aborto. Del total de 217 casos β -HCG + en el grupo SI MACS, se visualizó saco gestacional, en 185 de esos casos. En el grupo NO MACS de 634 casos con β -HCG +, se visualizaron sacos gestacionales en 523 de dichos casos:

TASA ABORTO	n ABORTO	n NO ABORTO	% ABORTO
SI MACS (n= 185)	44	141	23,78%
No MACS (n= 523)	107	416	20,46%
p	0,343		

Aunque la diferencia en la tasa de aborto no es significativa sí que se observa una menor tasa de aborto en los casos NO MACS.

Para hallar el valor de la **tasa de gestación a término**, partimos del total de pacientes del grupo que se someten al tratamiento y tenemos en cuenta cuántas de estas pacientes dan a luz.

TASA GESTACIÓN A TÉRMINO	n GESTACIÓN A TÉRMINO	n NO GESTACIÓN A TÉRMINO	% GESTACIÓN A TÉRMINO
SI MACS (n= 384)	141	243	36,72%
NO MACS (n= 1.263)	418	845	33,10%
p	0,189		

La tasa de gestación a término es mayor en los casos SI MACS pero la diferencia no llega a ser significativa.

RESULTADOS

Hasta ahora hemos comparado de manera general los resultados de todos los datos, solo comparando los casos en los que se ha realizado MACS, (SI MACS) y los que no, (NO MACS).

Para tener una información un poco más detallada vamos a ver los resultados teniendo en cuenta alguna variable más, para ello vamos a diferenciar tres grupos de estudio determinados por la procedencia de la muestra de semen, con varios subgrupos cada uno.

1. Grupo con muestras de semen en fresco de la pareja
2. Grupo con muestras de semen congeladas o criopreservadas de la pareja
3. Grupo con muestras de semen de donante (siempre congeladas o criopreservadas)

Antes de comenzar a valorar los resultados obtenidos con los distintos grupos y subgrupos de estudio vamos a revisar la población de muestras que tenemos de los diferentes grupos.

De los 1.408 casos NO MACS, 357 (25.36%) fueron casos con MF (muestra de semen en fresco de la pareja), 804 (57.10%) con MC (muestra de semen congelada de la pareja) y 247 casos (17.54%) con SD (semen de donante siempre de muestra espermática congelada de banco).

De los 479 casos SI MACS, 279 casos (58.24%) fueron con MF, 189 con MC (39.46%) y 11 casos con SD (2.30%).

	NO MACS (n= 1.408)	SI MACS (n=479)
MUESTRAS EN FRESCO HOMÓLOGAS (n= 636)	357 (25.36%)	279 (58.24%)
MUESTRAS CONGELADAS HOMÓLOGAS (n= 993)	804 (57.10%)	189 (39.46%)
MUESTRAS DE BANCO DE DONANTES (n= 258)	247 (17.54%)	11 (2.30%)

RESULTADOS

La n de los casos SI MACS en el grupo de las muestras de semen de donante es muy bajo, ya que al ser muestras de buena calidad y de personas de joven edad (normalmente menores de 30 años), no estaría indicada la realización de dicha técnica, en estos 11 casos se realizó la técnica por petición personal de los pacientes receptores.

A todos los pacientes o donantes de los casos utilizados se les realizó siempre, antes de la utilización de la muestra, un estudio espermático o seminograma. Al realizar esta prueba el número de muestras espermáticas Normozoospermicas (ningún parámetro espermático alterado) obtenidas fue de 94 en MF (24.23%), 36 en MC (9.28%) y 258 en SD (66.49%) y las muestras alteradas, OAT (en este caso en las que 3 de los parámetros espermático estaban alterados) fueron 542 en MF (36.16%), 957 en MC (63.84%) y 0 en muestras que procedían de banco de donante, SD (0%) ya que solo se aceptan donantes con Normozoospermia.

	N (n=388)	OAT (n=1.499)
MUESTRAS EN FRESCO HOMÓLOGAS (n=636)	94 (24.23%)	542 (36.16%)
MUESTRAS CONGELADAS HOMÓLOGAS (n=993)	36 (9.28%)	957 (63.84%)
MUESTRAS DE BANCO DE DONANTES (n=258)	258 (66.49%)	0 (0%)

En aquellos casos NO MACS, la población de muestras espermáticas según si eran N o si tenían parámetros espermáticos alterados, OAT, fue la siguiente: 51 N en MF (14.29%), 27 en MC (3.36%) y 247 en SD (100%) y de las muestras OAT, fueron 306 en MF (85.71%), 777 en MC (96.64%). No hubo ninguna muestra alterada en las muestras que procedían de banco de donante ya que solo se aceptan donantes con calidad N.

RESULTADOS

NO MACS (n=1.408)	N (n=325) (23.08%)	OAT (n=1.083)(76.92%)
MUESTRAS EN FRESCO HOMÓLOGAS (n=357)	51 (14.29%)	306 (85.71%)
MUESTRAS CONGELADAS HOMÓLOGAS (n=804)	27 (3.36%)	777 (96.64%)
MUESTRAS DE BANCO DE DONANTES (n=247)	247 (100%)	0 (0%)

En aquellos casos SI MACS, la población de muestras espermáticas según si eran N o si tenían parámetros espermáticos alterados, OAT, fue la siguiente: 43 muestras N en MF (15.41%), 9 en MC (4.76%) y 11 en SD (100%) y las muestras ALTERADAS (en la que los parámetros espermáticos OAT estaban alterados), fueron 236 en MF (84.59%), 180 en MC (95.24%). No hubo ninguna muestra alterada en las muestras que procedían de banco de donante ya que solo se aceptan donantes con calidad N.

SI MACS (n=479)	N (n=63) (13.15%)	OAT (n=416) (86.85%)
MUESTRAS EN FRESCO HOMÓLOGAS (n=279)	43 (15.41%)	236 (84.59%)
MUESTRAS CONGELADAS HOMÓLOGAS (n=189)	9 (4.76%)	180 (95.24%)
MUESTRAS DE BANCO DE DONANTES (n=11)	11 (100%)	0 (0%)

Además de la calidad de la muestra espermática, otra de las variables a tener en cuenta para el estudio fue el índice de fragmentación del ADN espermático.

El cálculo del índice de fragmentación espermática (en porcentaje) se realizó solo en 163 casos del total de los 1.887 casos recogidos y la mayoría pertenece al grupo de casos en los que se realizó MACS:

RESULTADOS

Índice de Fragmentación(IF) (n=163)	NO MACS (n=62) (38.04%)	SI MACS (n=101) (61.96%)	Promedio IF=23.45 ± 13.48
IF≤30 (n=131) (80.37%)	56 (42.75%)	75 (57.25%)	19.85 ± 5.51
IF>30 (n=32) (19.63%)	6 (18.75%)	26 (81.25%)	38.16 ± 9.35

El resultado del promedio del IF fue de 23.45 ± 13.48. De estos 163 casos, 131 (80.37%) tuvieron un IF≤30 con un promedio de IF de 19.85 ± 5.51 y 32 casos (19.63%) tuvieron un IF>30 con un promedio de IF de 38.16 ± 9.35 de desviación estándar.

Si calculamos el valor promedio de los IF en los distintos grupos de estudio cuando están por debajo y por encima de 30, nos sale:

Índice de Fragmentación (IF) (n=163)	Promedio IF NO MACS (n=62)	Promedio IF SI MACS (n=101)	Promedio IF=23.45 ± 13.48
IF≤30 (n=131)	19.75 ± 5.64	19.93 ± 5.45	19.85 ± 5.51
IF>30 (n=32)	38.00 ± 4.00	42.31 ± 11.32	38.16 ± 9.35

Siendo el resultado de los promedios de los IF más alto en los casos en los que si se utilizó MACS debido a que serían mayor las muestras alteradas en proporción a las normales (65 muestras OAT y 14 muestras N en el grupo SI MACS con muestras de semen en fresco, frente a 39 muestras OAT y 6 muestras N del grupo NO MACS de muestras de semen en fresco) y por ello se les indicó dicha técnica. Estos valores más elevados en el IF en las muestras SI MACS es lógico ya que una de las indicaciones fundamentales para realizar dicha técnica es tener un IF>30.

MUESTRAS EN FRESCO	IF≤30. Promedio resultado	IF>30 Promedio resultado
NO MACS NORMO (n=6)	(n=6) 18.83 ± 3.60	(n=0)
NO MACS OAT (n=39)	(n=34) 21.85 ± 4.85	(n=5) 37.00 ± 3.54
SI MACS NORMO (n=14)	(n=10) 18.55 ± 10.08	(n=4) 33.00 ± 3.37
SI MACS OAT (n=65)	(n=44) 20.18 ± 5.03	(n=21) 39.33 ± 11.07

RESULTADOS

Tras los cálculos generales comparando NO MACS y SI MACS y tras la revisión de la muestra poblacional de las diferentes variables a tener en cuenta, comenzaremos con el estudio más específico de los diferentes grupos y subgrupos a estudiar.

1. Grupo de muestras en fresco: SI MACS / NO MACS

Este grupo está formado por los pacientes que obtuvieron la muestra espermática el mismo día que se realiza la microinyección espermática ayudados de IMSI, a los óvulos de la donante de ovocitos.

1.1 Según calidad espermática

En este grupo de muestras en fresco vamos a comenzar valorando si los diferentes parámetros que queremos analizar, dependiendo de otra variable como puede ser la calidad de la muestra espermática, pueden influir en los resultados.

Muestras en fresco. <i>Óvulos inseminados</i>	SI MACS (n=279)	NO MACS (n=357)
Normozospermia	10,77 ± 3,01 (n=43)	10,00 ± 2,73 (n=51)
OAT	10,38 ± 2,49 (n=236)	11,21 ± 2,90 (n=306)

Ovocitos inseminados. Muestra poblacional

Parámetros a analizar:

Muestras en fresco <i>Tasa de fecundación</i>	SI MACS			NO MACS			p
	n	Promedio	σ	n	Promedio	σ	
Muestras totales	279	0,6928	0,17	357	0,6596	0,19	0,02
Muestras N	43	0,6816	0,18	51	0,6424	0,21	0,358
Muestras OAT	236	0,6948	0,17	306	0,6624	0,19	0,034

La **tasa de fecundación** nos da siempre mayor en los casos en los que si se ha realizado MACS, siendo además significativa la diferencia en el total de las muestras (sin diferenciar por calidades espermáticas) y también en el caso de las muestras OAT (alteradas), en el caso de muestras de calidad N no es significativa la diferencia.

RESULTADOS

Muestras en fresco <i>Nº embriones calidad A+B en día +3</i>	SI MACS			NO MACS			p
	n	Promedio	σ	n	Promedio	σ	
Muestras totales	279	2.45	1.78	357	2.69	1.96	0.168
Muestras N	43	2.67	2.17	51	2.63	2.02	0.781
Muestras OAT	236	2.42	1.70	306	2.70	1.96	0.165

Al valorar el **número de embriones de calidad A+B en día +3** obtenidos, la diferencia entre los obtenidos en los grupos SI MACS y NO MACS no es significativa en ninguno de los casos pero es mayor en el grupo NO MACS en las muestras totales (sin diferenciar por calidades espermáticas) y en las muestras de calidad OAT, y mayor en el grupo SI MACS cuando se trata de muestras espermáticas N. Habría que tener en cuenta que en muestras N, el número de ovocitos inseminados es mayor en el grupo SI MACS y en muestras OAT, el número de ovocitos inseminados es mayor en el grupo NO MACS.

Muestras en fresco <i>Tasa embriones calidad A+B en día +3</i>	SI MACS			NO MACS			p
	n	Promedio	σ	n	Promedio	σ	
Muestras totales	277	0,5012	0,274	352	0,502	0,267	0.168
Muestras N	43	0,5649	0,286	48	0,5083	0,282	0.781
Muestras OAT	234	0,4895	0,27	304	0,501	0,266	0.165

La n utilizada para hallar la **tasa de embriones de calidad A+B en día +3** es menor debido a que no todos los ciclos tuvieron al menos 1 embrión en día +3, para hallar la tasa tenemos en cuenta los ciclos con embriones en día +3.

Ocurre lo mismo con los resultados obtenidos de hallar las tasas de estos embriones calidad A+B en día +3, sale el promedio mayor en el grupo NO MACS tanto en el número de muestras es fresco totales, sin diferenciar por calidades espermáticas y cuando las muestras son alteradas (OAT), pero en el caso de muestras normozoospermicas (N), sale mejor el promedio de esta tasa en el grupo SI MACS. Al igual que con el número de embriones de calidad A+B en día +3. Podría influir en estos resultados el número de ovocitos inseminados de los que se parten.

Hasta ahora, para el análisis de los anteriores parámetros hallados, hemos cogido toda la población sin tener en cuenta el día en el que se realiza la transferencia embrionaria, a partir de ahora, para hallar los parámetros siguientes, tasa de gestación

RESULTADOS

clínica, tasa de aborto y tasa de gestación a término, solo tendremos en cuenta las muestras o los pacientes que realizaron la transferencia embrionaria en el día +3 postpunción.

- 216 casos SI MACS de MF tuvieron transferencia de embriones en día +3
- 317 casos NO MACS de MF tuvieron transferencia de embriones en día +3.

Muestras en fresco <i>Tasa de Gestación clínica</i>	SI MACS			NO MACS			p
	n gestación	n no gestación	Tasa gestación	n gestación	n no gestación	Tasa gestación	
Muestras totales	125	91	57,87%	150	167	47,32%	0,017
Muestras N	19	12	61,29%	19	22	46,34%	0,208
Muestras OAT	106	79	57,30%	131	145	47,46%	0,038

Como vemos el promedio de la **tasa de gestación clínica** es mayor en todos los tipos de calidades espermáticas en el grupo SI MACS, siendo esta diferencia significativa con el grupo NO MACS, tanto en las muestras en fresco totales (sin tener en cuenta dichas calidades espermáticas) y en los casos en los que se utilizó muestra espermática con calidad OAT, en los casos de muestras N de semen en fresco, la diferencia entre ambos grupos no llegó a ser significativa.

Para hallar la **tasa de aborto** debemos partir de todos aquellos casos en los que siendo el resultado de la β -HCG positiva en día +15 postransferencia embrionaria, se llega a visualizar saco embrionario.

De 19 casos β -HCG +, 14 casos con sacos gestacionales (SG) fueron visualizados en el grupo SI MACS de las muestras N, y en las muestras OAT, de 106 casos de β -HCG +, se visualizaron 92 casos con SG.

De 19 casos β -HCG +, se visualizaron SG en 15 de los casos de muestras N en el grupo NO MACS, y en las muestras espermáticas OAT, de los 131 casos de β -HCG +, se visualizaron SG en 107 de estos casos.

RESULTADOS

Muestras en fresco <i>Tasa de aborto</i>	SI MACS			NO MACS			p
	n aborto	n no aborto	Tasa aborto	n aborto	n no aborto	Tasa aborto	
Muestras totales	28	78	26,42%	26	96	21,31%	0,366
Muestras N	3	11	21,43%	3	12	20,00%	0,924
Muestras OAT	25	67	27,17%	23	84	21,50%	0,351

Vemos que la tasa de aborto es menor siempre en el grupo NO MACS de las muestras espermáticas en fresco, independientemente de las calidades espermáticas de las mismas, no siendo significativa la diferencia con el grupo SI MACS.

Muestras en fresco <i>Tasa de gestación a término</i>	SI MACS			NO MACS			p
	n a término	n no a término	Tasa a término	n a término	n no a término	Tasa a término	
Muestras totales	78	138	36,11%	96	221	30,28%	0,159
Muestras N	11	20	35,48%	12	29	29,27%	0,575
Muestras OAT	67	118	36,22%	84	192	30,43%	0,195

Para hallar la tasa de embarazo o gestación a término, volvemos a partir del número total de casos de muestras en fresco (MF) que se realizaron transferencia embrionaria en día +3 postpunción y vemos cuántas de estas llegan a dar lugar a un nacimiento de un recién nacido vivo.

Vemos que esta **tasa de gestación a término** es mayor en todos los casos cuando se ha realizado la técnica MACS, SI MACS, frente al grupo en el que no se ha utilizado la técnica, es decir el grupo NO MACS. En ninguno de los tipos de muestras diferenciadas por su calidad espermática, se vio que esa diferencia entre los dos grupos de estudio, fuese significativa.

1.2 Según el IF (índice de fragmentación espermática)

Muestra poblacional.

Muestras en fresco <i>Óvulos inseminados</i>	SI MACS (n=79)	NO MACS (n=45)
IF≤30	11,07 ± 2,66 (n=54)	12,95 ± 3,02 (n=40)
IF>30	9,80 ± 2,75 (n=25)	11,60 ± 1,34 (n=5)

RESULTADOS

Parámetros a analizar:

Muestras en fresco <i>Tasa de fecundación</i>	SI MACS			NO MACS			p
	n	Promedio	σ	n	Promedio	σ	
Muestras IF \leq 30	54	0,7	0,14	40	0,63	0,17	0,028
Muestras IF>30	25	0,72	0,16	5	0,75	0,16	0,914

La **tasa de fecundación** teniendo en cuenta el IF de las muestras, es más alta en el grupo SI MACS en el caso de las muestras con IF \leq 30, además en este caso la diferencia es significativa si la comparamos con el grupo NO MACS. En el caso de las muestras con IF>30 el promedio de la tasa de fecundación es mayor en el grupo de estudio NO MACS pero no siendo en este caso significativa la diferencia.

Muestras en fresco <i>Nº embriones calidad A+B en +3</i>	SI MACS			NO MACS			p
	n	promedio	σ	n	promedio	σ	
Muestras IF \leq 30	54	2,31	1,9	40	2,88	2,34	0,285
Muestras IF>30	25	2,72	1,54	5	2,2	1,78	0,552

El promedio del **número de embriones de calidad A+B en día +3** en los casos con IF \leq 30 es mayor en el grupo NO MACS, sin embargo en los casos con IF>30 es mayor en el grupo SI MACS. Las diferencias entre los dos grupos en ningún caso llegan a ser significativas.

Muestras en fresco <i>Tasa embriones calidad A+B en +3</i>	SI MACS			NO MACS			p
	n	promedio	σ	n	promedio	σ	
Muestras IF \leq 30	53	0,465	0,314	38	0,4936	0,248	0,796
Muestras IF>30	25	0,55	0,199	5	0,343	0,237	0,085

Ocurre lo mismo con la **tasa de embriones de calidad A+B en día +3**, en los casos con IF \leq 30 es mayor en el grupo NO MACS y en los casos con IF>30 es mayor en el grupo SI MACS, sin llegar a ser significativa la diferencia de los valores entre ambos grupos de estudio.

A partir de ahora, para el cálculo de los siguientes parámetros, solo tomaremos los casos en los que la transferencia embrionaria fue realizada en día +3 postpunción en lugar de toda la población.

RESULTADOS

Muestras en fresco Tasa de gestación clínica	SI MACS			NO MACS			p
	n gestación	n no gestación	Tasa gestación	n gestación	n no gestación	Tasa gestación	
IF≤30	27	16	62,79%	17	17	50,00%	0,26
IF>30	9	11	45,00%	0	4	0,00%	0,09

La **tasa de gestación clínica** (porcentaje de β -HCG + en día +15 postransferencia embrionaria) es mayor en el grupo SI MACS, independientemente de si los IF (índices de fragmentación espermática) son mayores o menores de 30%. Esta diferencia entre los resultados del grupo SI MACS y NO MACS no llega a ser significativa ni en los casos con IF≤30 ni en los que el IF>30. Hay que tener en cuenta que la n del grupo NO MACS en los casos con IF>30 es muy bajo.

En el caso del grupo IF≤30, de los 27 embarazos con β -HCG + del grupo SI MACS, en 21 de los casos se visualizó SG. En 15 casos se visualizó SG, de los 17 β -HCG + del grupo NO MACS con IF≤30.

En el caso del grupo con IF>30, de los 9 casos de β -HCG + del grupo SI MACS se llegó a visualizar SG en 8 casos, en el grupo NO MACS no hubo ningún caso con β -HCG +, por lo que no se puede determinar por tanto una tasa de aborto en este subgrupo y compararlo con el grupo SI MACS para los casos con IF>30.

Muestras en fresco Tasa de aborto	SI MACS			NO MACS			p
	n aborto	n no aborto	Tasa aborto	n aborto	n no aborto	Tasa aborto	
IF≤30	5	16	23,81%	4	11	26,67%	0,845
IF>30	3	5	37,50%	0	0		

En el caso del grupo de muestras en fresco con IF≤30, la **tasa de aborto** es menor en el grupo SI MACS aunque no es una diferencia significativa si la comparamos con el resultado del grupo NO MACS.

Muestras en fresco Tasa de gestación a término	SI MACS			NO MACS			p
	n a término	n no a término	Tasa a término	n a término	n no a término	Tasa a término	
IF≤30	16	27	37,21%	11	23	32,35%	0,657
IF>30	5	15	25,00%	0	4	0,00%	0,261

RESULTADOS

Tanto en los casos con $IF \leq 30$ o en los que el $IF > 30$, la **tasa de gestación a término** es mayor en el grupo SI MACS aunque no siendo significativa la diferencia al compararla con el grupo NO MACS. Aún así habría que pararse a ver la gran diferencia en el promedio de la tasa de gestación a término cuando dentro del grupo SI MACS, los IF son mayores o menores de 30.

1.3 Según la edad de los pacientes, edad ≤ 40 años y edad > 40 años.

Muestra poblacional.

Muestras en fresco. Óvulos inseminados	SI MACS (n=279)	NO MACS (n=357)
≤ 40 años	10,51 \pm 2,55 (n=117)	11,34 \pm 3,03 (n=155)
> 40 años	10,43 \pm 2,61 (n=162)	10,73 \pm 2,73 (n=202)

Parámetros a analizar:

Muestras en fresco Tasa de fecundación	SI MACS			NO MACS			p
	n	Promedio	σ	n	Promedio	σ	
Edad ≤ 40	117	0,6935	0,18	155	0,6418	0,2	0,015
Edad > 40	162	0,6922	0,16	202	0,6732	0,188	0,405

Cuando comparamos los dos grupos de estudio SI MACS frente a NO MACS, independientemente de si se trata de los casos en los que los varones tenían más o menos de 40 años, la **tasa de fecundación** es mejor en el grupo de estudio SI MACS, siendo significativa esta diferencia en los resultados obtenidos en los casos en los que los varones tenían una edad ≤ 40 años y no siendo significativa en los casos en los que los varones tenían una edad > 40 años.

Muestras en fresco Nº embriones calidad A+B en +3	SI MACS			NO MACS			p
	n	Promedio	σ	n	Promedio	σ	
Edad ≤ 40	117	2,62	1,82	155	2,56	1,86	0,713
Edad > 40	162	2,33	1,74	202	2,792	2,03	0,036

El **número de embriones de calidad A+B** en día +3 postpunción es mayor en el grupo SI MACS cuando los pacientes tienen una edad ≤ 40 años cuando lo

RESULTADOS

comparamos con el grupo NO MACS, aunque no llega a ser significativa la diferencia. En los casos en los que los varones tenía una edad >40 años, el número de embriones de calidades A+B en día +3 era mayor en el grupo NO MACS, siendo además significativa la diferencia cuando lo comparamos con el resultado del grupo SI MACS. En este caso no podemos decir, que igual los resultados podrían depender del número de ovocitos inseminados, ya que en este caso fue mayor en el grupo NO MACS tanto para los casos de pacientes con una edad ≤40 años como para los pacientes con una edad >40 años.

Muestras en fresco <i>Tasa embriones calidad A+B en +3</i>	SI MACS			NO MACS			p
	n	Promedio	σ	n	Promedio	σ	
Edad ≤40	116	0,5235	0,272	155	0,4703	0,263	0,108
Edad >40	161	0,485	0,275	197	0,527	0,269	0,13

La **tasa de embriones de calidad A+B en día +3** postpunción, al igual que ocurría con el número de embriones de calidad A+B en día +3, es mejor o tiene mejores resultados en el grupo SI MACS cuando los pacientes con muestra en fresco tienen una edad ≤40 años, y tienen mejores resultados en el grupo NO MACS, cuando los pacientes con muestra en fresco tienen una edad >40 años. No siendo significativa la diferencia entre los resultados de ambos grupos en ninguno de los casos, independientemente de las edades de los pacientes en el momento de realizar el tratamiento.

El número de casos utilizados a partir de ahora en los diferentes parámetros a analizar son menores ya que solo se tendrán en cuenta aquellos casos cuya transferencia de embriones haya tenido lugar en día +3 postpunción.

Muestras en fresco <i>Tasa de gestación clínica.</i>	SI MACS			NO MACS			p
	n	n no gestación	Tasa gestación	n	n no gestación	Tasa gestación	
Edad ≤40	53	41	56,38%	64	73	46,72%	0,149
Edad >40	72	50	59,02%	86	94	47,78%	0,055

La **tasa de gestación clínica** es significativamente mayor en el grupo SI MACS en aquellos casos en los que los pacientes tenían una edad >40 años, en los casos en los que los pacientes tenían una edad ≤ 40 años, sigue siendo mayor la tasa

RESULTADOS

de gestación clínica en el grupo SI MACS pero no llegando a ser significativa la diferencia entre los resultados de los dos grupos de estudio.

De los 53 casos β -HCG + en el grupo SI MACS en los pacientes con edad ≤ 40 años, se llegaron a visualizar SG en 43 de estos casos, en los pacientes con edad >40 años de este mismo grupo se visualizaron SG en 63 casos de los 72 que dieron β -HCG +.

En el grupo de estudio NO MACS, en los pacientes con edad ≤ 40 años se visualizaron SG en 52 casos de los 64 que dieron β -HCG +, mientras que se visualizaron SG en 70 casos de los 86 que dieron β -HCG + en los casos de pacientes con edad >40 años.

Muestras en fresco <i>Tasa de aborto</i>	SI MACS			NO MACS			p
	n aborto	n no aborto	Tasa aborto	n aborto	n no aborto	Tasa aborto	
Edad ≤ 40	7	36	16,28%	12	40	23,08%	0,41
Edad >40	21	42	33,33%	14	56	20,00%	0,08

La **tasa de aborto** es mejor en el grupo SI MACS en aquellos pacientes con edad ≤ 40 años, y en el grupo NO MACS es mejor cuando los pacientes tienen una edad >40 años, no existen diferencias significativas entre ambos grupos de estudio teniendo en cuenta la edad de los pacientes.

Muestras en fresco <i>Tasa de gestación a término</i>	SI MACS			NO MACS			p
	n a término	n no a término	Tasa a término	n a término	n no a término	Tasa a término	
Edad ≤ 40	36	58	38,30%	40	97	29,20%	0,41
Edad >40	42	80	34,43%	56	124	31,11%	0,546

La **tasa de gestación a término** es mejor en el grupo SI MACS tanto para los pacientes con edad ≤ 40 años que para los que tenían más de 40 años. En ninguno de los casos la diferencia con el otro grupo de estudio, NO MACS, fue significativa.

RESULTADOS

2. Grupo de muestras congeladas: SI MACS / NO MACS

2.1 Según calidad espermática

Muestra poblacional.

Muestras congeladas. <i>Óvulos inseminados</i>	SI MACS (n=189)	NO MACS (n=804)
Normozoospermia	10,89 ± 3,22 (n=9)	9,78 ± 2,47 (n=27)
OAT	10,18 ± 2,15 (n=180)	10,71 ± 2,80 (n=777)

Parámetros a analizar:

Muestras congeladas <i>Tasa de fecundación</i>	SI MACS			NO MACS			p
	n	Promedio	σ	n	Promedio	σ	
Muestras totales	189	0,695	0,17	804	0,6418	0,19	0,001
Muestras N	9	0,74	0,12	27	0,6589	0,19	0,368
Muestras OAT	180	0,6927	0,17	777	0,6412	0,19	0,002

La **tasa de fecundación** es mayor en el grupo SI MACS en las muestras de semen criopreservadas, tanto en muestras espermáticas N como en muestras espermáticas OAT, siendo significativa la diferencia entre los resultados de ambos grupos en los pacientes con muestras espermáticas OAT. Si no tenemos en cuenta las calidades espermáticas, es significativamente mayor la tasa de fecundación cuando se realiza MACS en las muestras criopreservadas.

Muestras congeladas <i>Nº embriones calidad A+B en día +3</i>	SI MACS			NO MACS			p
	n	Promedio	σ	n	Promedio	σ	
Muestras totales	189	2,619	1,58	804	2,655	1,7	0,747
Muestras N	9	2,667	2,29	27	2,48	1,82	0,914
Muestras OAT	180	2,62	2,416	777	2,66	1,7	0,705

El **número total de embriones con calidad A+B** en día +3 es mayor en el grupo SI MACS en los casos de muestra espermática normozoospermica (N), sin embargo es mayor en el grupo de estudio NO MACS cuando se trata de muestras espermáticas alteradas (OAT). En ninguno de los dos casos la diferencia entre los

RESULTADOS

valores es significativa cuando comparamos los grupos SI MACS y NO MACS. En este caso es verdad que el número de ovocitos inseminados en las muestras espermáticas N era mayor en el grupo SI MACS y en las muestras OAT en el grupo NO MACS. Si no tenemos en cuenta las calidades espermáticas, el número de embriones de calidades A+B en día +3 es un poco mayor en el grupo NO MACS en las muestras de semen criopreservadas de la pareja, sin llegar a ser significativa tampoco la diferencia.

Muestras congeladas <i>Tasa embriones calidad A+B en día +3</i>	SI MACS			NO MACS			p
	n	Promedio	σ	n	Promedio	σ	
Muestras totales	189	0,55	0,25	797	0,5265	0,267	0,283
Muestras N	9	0,443	0,314	27	0,523	0,27	0,615
Muestras OAT	180	0,5568	0,246	770	0,5266	0,267	0,222

Al hallar la **tasa de embriones con calidad A+B en día +3** postpunción, sin embargo, sale mayor en el caso de las muestras N en el grupo NO MACS y en el caso de las muestras OAT en el grupo SI MACS, no siendo significativa la diferencia entre los resultados de ambos grupos de estudio. Si no tuviésemos en cuenta la calidad de las muestras, sería mayor también la tasa de embriones A+B en día +3 en el grupo de estudio SI MACS.

Las n a partir de ahora, para el cálculo de los siguientes parámetros, disminuye porque solo se tendrán en cuenta los casos que tuvieron transferencia de embriones en día +3 postpunción.

Muestras congeladas <i>Tasa de gestación clínica</i>	SI MACS			NO MACS			p
	n gestación	n no gestación	Tasa gestación	n gestación	n no gestación	Tasa gestación	
Muestras totales	89	73	54,94%	369	351	51,25%	0,396
Muestras N	3	3	50,00%	11	11	50,00%	1
Muestras OAT	86	70	55,13%	358	340	51,29%	0,386

En este caso, en el que usamos muestras de semen de la pareja criopreservada, la **tasa de gestación clínica** nos sale igual en los dos grupos de estudio SI MACS y NO MACS cuando las muestras son de buena calidad, N. Cuando se trata de muestras con una calidad OAT, la tasa de gestación clínica es mayor en el grupo de estudio SI MACS cuando las muestras de semen utilizadas son muestras criopreservadas de la pareja. Si no tenemos en cuenta las calidades espermáticas de

RESULTADOS

las muestras, en el caso de muestras criopreservadas de la pareja en general, esta tasa es mayor en el grupo SI MACS. En ninguno de los casos la diferencia de los valores entre ambos grupos fue significativa.

En el grupo SI MACS con muestras N, se visualizaron SG en los tres casos que dieron β -HCG +, sin embargo en los pacientes con la calidad espermática alterada (OAT) de este mismo grupo, se visualizaron SG en 73 casos de los 86 que dieron β -HCG +.

En el grupo de estudio NO MACS, con muestras espermáticas normales (N), se visualizaron SG en 9 de los 11 casos que dieron β -HCG + y en el caso de muestras espermáticas alteradas (OAT), se visualizaron en 296 casos de los 358 casos que dieron β -HCG +.

Muestras congeladas <i>Tasa de Aborto</i>	SI MACS			NO MACS			p
	n aborto	n no	Tasa	n aborto	n no	Tasa	
Muestras totales	15	61	19,74%	64	241	20,98%	0,81
Muestras N	0	3	0,00%	2	7	22,22%	0,371
Muestras OAT	15	58	20,55%	62	234	20,95%	0,94

La n de las muestras espermáticas de calidad N es muy baja, esto influye para que en este tipo de muestras aún siendo muy grande la diferencia en la **tasa de aborto** de ambos grupos de estudio SI MACS y NO MACS, no sea realmente significativa esa diferencia entre ambos grupos. En el caso de muestras espermáticas con calidad OAT, la tasa de aborto es un poco menor en el grupo SI MACS pero casi igual, no siendo significativa la diferencia en los resultados de ambos grupos de estudio. Si no tenemos en cuenta la calidad espermática en las muestras criopreservadas de las parejas, el valor de la tasa de aborto es un poco menor en el grupo de estudio SI MACS.

Muestras congeladas <i>Tasa de gestación a término</i>	SI MACS			NO MACS			p
	n a término	n no a término	Tasa a término	n a término	n no a término	Tasa a término	
Muestras totales	61	101	37,65%	243	477	33,75%	0,345
Muestras N	3	3	50,00%	7	15	31,82%	0,41
Muestras OAT	58	98	37,18%	236	462	33,81%	0,423

RESULTADOS

Tanto en los casos de muestras espermáticas de calidad N como en los casos con muestras espermáticas OAT de las muestras criopreservadas de la pareja, la tasa de gestación a término es mayor en el grupo de estudio SI MACS, incluso no teniendo en cuenta esa calidad espermática, la **tasa de gestación a término** en general, cuando se trata de muestras de semen de la pareja criopreservada, es mayor en el grupo de estudio SI MACS. En ninguno de los casos, aún siendo mayor el resultado, la diferencia de este con el grupo de estudio NO MACS llega a ser significativa.

2.2 Según el IF (índice de fragmentación espermática)

En el caso de las muestras congeladas o criopreservadas de la pareja, ninguna muestra tenía el índice de fragmentación por encima de 30%, es lógico, hay que pensar que a todas las muestras con la fragmentación espermática alta se le recomienda traer muestra en fresco, por lo que los únicos resultados que tenemos con muestras congeladas son con $IF \leq 30$, por este motivo no puedo comparar y ver si hay diferencias significativas entre estos grupos cuando el $IF > 30$, pero si podemos ver qué ocurre con este tipo de muestras ($IF \leq 30$) cuando usamos o no la técnica MACS en ellas.

Muestra poblacional.

Muestras congeladas.	SI MACS (n=22)	NO MACS (n=17)
Óvulos inseminados		
IF\leq30	11,00 \pm 3,10 (n=21)	11,06 \pm 3,00 (n=16)

Parámetros a analizar:

Muestras congeladas	SI MACS			NO MACS			p
Tasa de fecundación	n	Promedio	σ	n	Promedio	σ	
Muestras IF\leq30	21	0,68	0,2	16	0,59	0,23	0,267

La **tasa de fecundación**, en el grupo de muestras espermáticas criopreservadas de la pareja, en este caso, todas con $IF \leq 30$, es mayor en el grupo de

RESULTADOS

estudio SI MACS, no siendo significativa la diferencia con el resultado obtenido en el otro grupo NO MACS.

Muestras congeladas Nº embriones calidad A+B en +3	SI MACS			NO MACS			p
	n	media	σ	n	media	σ	
Muestras IF \leq 30	21	2,19	1,56	16	2,5	2	0,66

El **número de embriones con calidad A+B en día +3** en las muestras criopreservadas con IF \leq 30, es mayor en el grupo NO MACS, no siendo significativa la diferencia.

La n puede disminuir al hallar la **tasa de embriones de calidad A+B en día +3** porque no se pueden tener en cuenta aquellos casos que no tuvieron embriones.

Muestras congeladas Tasa embriones calidad A+B en +3	SI MACS			NO MACS			p
	n	Promedio	σ	n	Promedio	σ	
Muestras IF \leq 30	21	0,482	0,25	15	0,537	0,321	0,357

La tasa de embriones de calidad A+B en día +3 postpunción, también en este caso es mayor en el grupo NO MACS, no siendo significativa la diferencia entre los resultados de ambos grupos de estudio SI MACS y NO MACS.

Para hallar los siguientes parámetros solo tendremos en cuenta aquellos casos que tuvieron transferencia embrionaria en día +3 postpunción, por eso la n es menor.

Muestras congeladas Tasa de Gestación clínica	SI MACS			NO MACS			p
	n gestación	n no gestación	Tasa gestación	n gestación	n no gestación	Tasa gestación	
IF \leq 30	11	4	73,33%	5	7	41,67%	0,096

La n es muy pequeña y ello puede ser el motivo por lo que la diferencia entre el resultado en la **tasa de gestación clínica** en el grupo SI MACS y NO MACS no sea significativo en el caso de muestras criopreservadas con IF \leq 30, pero es mucho mayor el grupo SI MACS.

Muestras congeladas Tasa de Aborto	SI MACS			NO MACS			p
	n aborto	n no aborto	Tasa aborto	n aborto	n no aborto	Tasa aborto	
IF \leq 30	1	7	12,50%	0	5	0,00%	0,757

RESULTADOS

Aunque la n es muy baja, la **tasa de aborto** en MC con IF≤30 es menor en el grupo NO MACS, no siendo significativa la diferencia.

Muestras congeladas Tasa de Gestación a término	SI MACS			NO MACS			p
	n a término	n no término	Tasa a término	n a término	n no término	Tasa a término	
IF≤30	7	8	46,67%	5	7	41,67%	0,897

La **tasa de gestación a término** es mayor en el grupo SI MACS en las MC con IF≤30. Esta diferencia entre ambos grupos no es significativa.

Habría que tener muy en cuenta que para los últimos parámetros hallados en MC con IF≤30 contamos con una n muy pequeña.

2.3 Según la edad de los pacientes, edad ≤40 años y edad >40 años.

Muestra poblacional.

Muestras congeladas.	SI MACS	NO MACS
Óvulos inseminados	(n=189)	(n=804)
≤ 40 años	10,46 ± 2,02 (n=78)	10,81 ± 2,87 (n=357)
> 40 años	10,04 ± 2,32 (n=111)	10,58 ± 2,73 (n=447)

Parámetros a analizar:

Muestras congeladas Tasa de fecundación	SI MACS			NO MACS			p
	n	Promedio	σ	n	Promedio	σ	
Edad ≤40	78	0,6977	0,18	357	0,6521	0,18	0,047
Edad >40	111	0,6931	0,17	447	0,6336	0,19	0,008

La **tasa de fecundación** sigue siendo mayor en el grupo SI MACS cuando hablamos de muestras congeladas o criopreservadas, independientemente de la edad de los pacientes en el momento de aportar la muestra de semen, ya sea si estos estaban por encima o por debajo de los 40 años de edad. Además de ser mayor el

RESULTADOS

resultado la diferencia con el grupo NO MACS es significativa en los dos rangos de edades estudiadas.

Muestras congeladas <i>Nº embriones calidad A+B en +3</i>	SI MACS			NO MACS			p
	n	Promedio	σ	n	Promedio	σ	
Edad ≤ 40	78	2,87	1,65	357	2,77	1,69	0,722
Edad >40	111	2,44	1,52	447	2,56	1,71	0,516

El **número de embriones con calidades A+B en día +3** postpunción del grupo de muestras criopreservadas, fue mayor en el grupo SI MACS en el caso de muestras espermáticas de pacientes con edad ≤ 40 años (siendo el número de ovocitos inseminados mayor en el grupo NO MACS también en este rango de edad) y sin embargo mayor en el grupo NO MACS en el caso de muestras espermáticas de pacientes con edad >40 años. Ninguno de los resultados obtenidos tenía una diferencia significativa al compararla con el otro grupo de estudio.

Muestras congeladas <i>Tasa embriones calidad A+B en +3</i>	SI MACS			NO MACS			p
	n	Promedio	σ	n	Promedio	σ	
Edad ≤ 40	78	0,5742	0,252	356	0,5353	0,262	0,223
Edad >40	111	0,5354	0,249	441	0,5195	0,27	0,619

Sin embargo aún siendo mayor el número de embriones con calidad A+B en día +3 en pacientes con rango de edad >40 años en el grupo NO MACS, al hallar la **tasa de embriones con calidades A+B en día +3**, es en el grupo SI MACS donde este resultado sale mayor. También en el rango de edad ≤ 40 años, la tasa de embriones con calidad A+B en día +3 es mayor cuando se trata de muestras criopreservadas de los pacientes. No se halló diferencia significativa entre los resultados de ambos grupos SI MACS y NO MACS.

Para el cálculo de los siguientes parámetros a analizar solo tendremos en cuentas aquellos casos en los que hubo transferencia embrionaria en día +3 postpunción, por eso la n de los casos es menor.

RESULTADOS

Muestras congeladas <i>Tasa de gestación clínica</i>	SI MACS			NO MACS			p
	n gestación	n no gestación	Tasa gestación	n gestación	n no gestación	Tasa gestación	
Edad ≤40	43	27	61,43%	166	167	49,85%	0,078
Edad >40	46	46	50,00%	203	184	52,45%	0,672

La **tasa de gestación clínica** es mayor en el grupo SI MACS cuando los pacientes tienen una edad ≤40 años en las muestras criopreservadas, y en el caso de muestras criopreservadas de pacientes con edad >40 años, la tasa de gestación clínica es mayor en el grupo NO MACS, no siendo significativa la diferencia en ninguno de los casos.

De los 43 casos SI MACS en pacientes ≤40 años con β -HCG+, se visualizaron SG en 38 de esos casos y de los 46 casos SI MACS de pacientes con edad >40 años se observaron SG en 38 de estos casos. En el grupo NO MACS, en los pacientes con edades ≤40 años se visualizaron SG por ecografía en 140 casos de los 166 que dieron β -HCG+ y en los pacientes con edades >40 años se visualizaron SG en 165 casos de los 203 en los que se obtuvieron β -HCG+.

Muestras congeladas <i>Tasa de aborto</i>	SI MACS			NO MACS			p
	n aborto	n no	Tasa	n aborto	n no	Tasa	
Edad ≤40	8	30	21,05%	26	114	18,57%	0,41
Edad >40	7	31	18,42%	38	127	23,03%	0,08

La **tasa de aborto** en muestras congeladas es menor en general, sin tener en cuenta los rangos de edades, en el grupo SI MACS, cuando los pacientes tienen una edad >40 años, sigue siendo menor la tasa de aborto, sin embargo, cuando los pacientes tienen una edad ≤40 años, la tasa de aborto es menor en el grupo de estudio NO MACS. En ninguno de los casos es significativa la diferencia entre ambos grupos, SI MACS y NO MACS.

Muestras congeladas <i>Tasa de gestación a término</i>	SI MACS			NO MACS			p
	n a término	n no a término	Tasa a término	n a término	n no a término	Tasa a término	
Edad ≤40	30	40	42,86%	114	219	34,23%	0,41
Edad >40	31	61	33,70%	129	258	33,33%	0,546

RESULTADOS

Para hallar la **tasa de gestación a término** partimos de todos los casos que tuvieron transferencia embrionaria en día +3 postpunción y vemos cuántos de estos casos finalmente tienen un recién nacido vivo. Al realizar el cálculo vemos que esta tasa de gestación a término es mayor en el grupo SI MACS tanto en pacientes con edades ≤ 40 años como en pacientes con edades >40 años, cuando la muestra espermática utilizada ha estado criopreservada, no siendo significativa la diferencia de los resultados entre los grupos estudiados.

3. Grupo de muestras de semen de donante: SI MACS / NO MACS

Muestra Poblacional.

Muestras semen Donante	SI MACS (n=11)	NO MACS (n=247)
Óvulos inseminados	9,64 \pm 2,66	10,22 \pm 2,55

Parámetros a analizar:

La n del grupo SI MACS cuando trabajamos con muestra de semen de donante criopreservada es muy baja, ya que debido a la calidad Normozoospermica (N) de este tipo de muestras, no estaría indicado el uso de la técnica MACS.

Muestras semen de Donante

Tasa de fecundación

SI MACS			NO MACS			p
n	promedio	σ	n	promedio	σ	
11	0,6627	0,18	247	0,6691	0,18	0,701

La **tasa de fecundación** es ligeramente mayor en el grupo NO MACS, no siendo la diferencia entre ellas significativa.

Muestras semen de Donante

Nº embriones calidad A+B en +3

SI MACS			NO MACS			p
n	promedio	σ	n	promedio	σ	
11	2	0,77	247	2,7	1,51	0,117

El **número de embriones de calidad A+B en día +3** postpunción es mayor en el grupo NO MACS, no siendo la diferencia de los resultados entre ambos grupos, significativa.

RESULTADOS

Muestras semen de Donante

Tasa embriones calidad A+B en +3

SI MACS			NO MACS			p
n	promedio	σ	n	promedio	σ	
11	0,49	0,162	246	0,5493	0,248	0,4

Al igual que el número de embriones con calidad A+B en día +3, la **tasa de embriones de calidad A+B en +3**, también es mayor en el grupo NO MACS, la diferencia no es significativa.

Para hallar la **tasa de gestación clínica** tendremos solo en cuenta aquellos casos en los que hubo transferencia embrionaria en día +3 postpunción, por ello la n es aún menor, en el caso del grupo SI MACS, solo 6 casos.

Muestras semen de Donante

Tasa de Gestación clínica

SI MACS			NO MACS			p
n gestación	n no gestación	Tasa gestación	n gestación	n no gestación	Tasa gestación	
3	3	50,0%	115	111	50,88%	0,966

Aún así, con esa n tan pequeña, la tasa de gestación clínica en el grupo SI MACS es similar, solo algo menor que en el grupo NO MACS y para nada estadísticamente significativo.

De los 3 casos β -HCG + en el grupo SI MACS se observaron SG en los 3 casos y de los 115 casos con β -HCG +, en el grupo NO MACS, se visualizaron SG en 96 de estos casos.

Muestras semen de Donante

Tasa de aborto

SI MACS			NO MACS			p
n aborto	n no aborto	Tasa aborto	n aborto	n no aborto	Tasa aborto	
1	2	33,33%	17	79	17,7%	0,49

La **tasa de aborto** es menor en el grupo NO MACS.

RESULTADOS

Muestras semen de Donante

Tasa de Gestación a término

SI MACS			NO MACS			p
n a término	n no a término	Tasa a término	n a término	n no a término	Tasa a término	
2	4	33,33%	79	147	34,96%	0,934

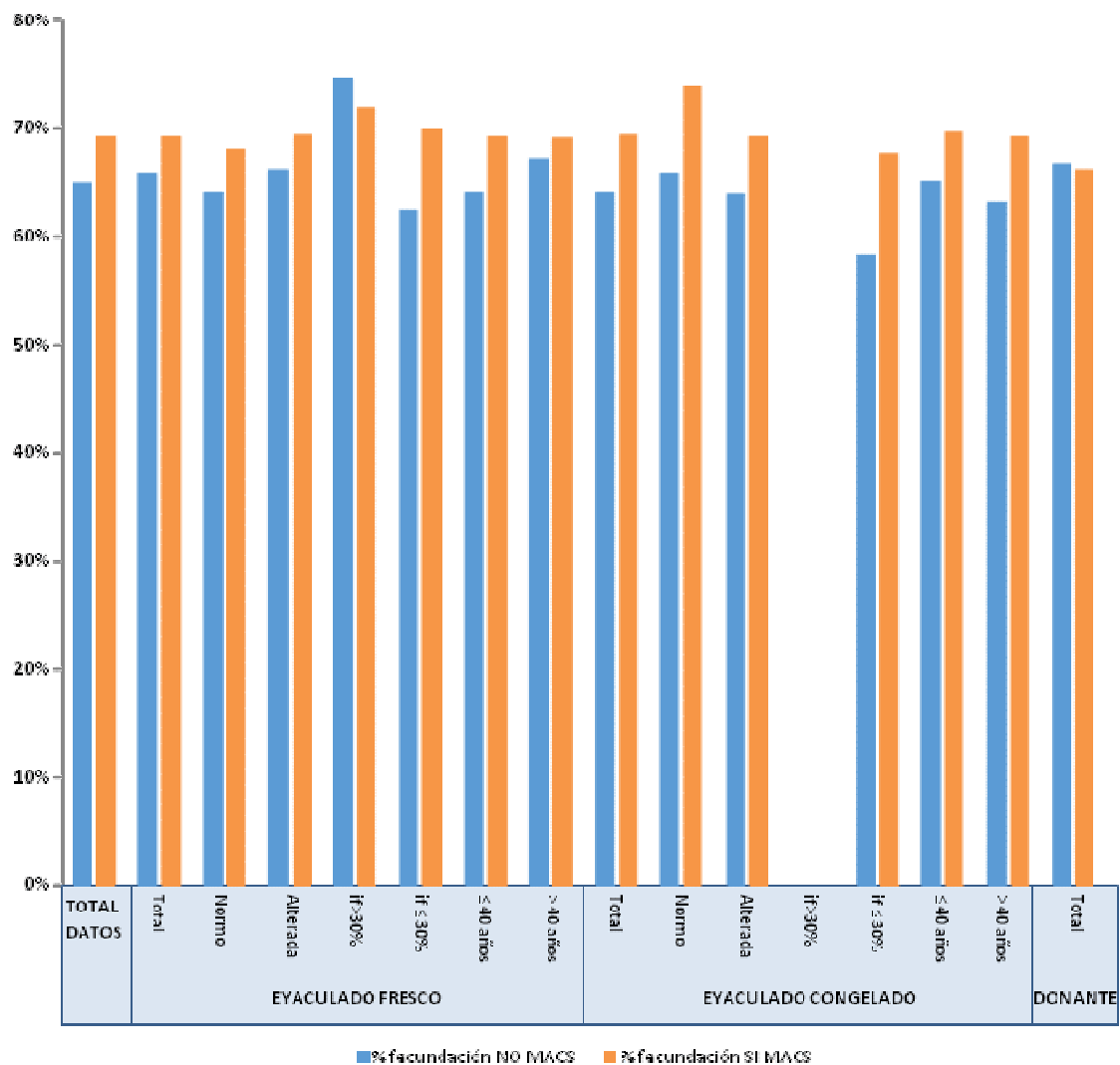
La **tasa de gestación a término** es algo mayor en el grupo NO MACS, no siendo significativa la diferencia del resultado entre ambos grupos de estudio.

Hay que tener en cuenta que la n es muy baja a la hora de analizar estos últimos parámetros.

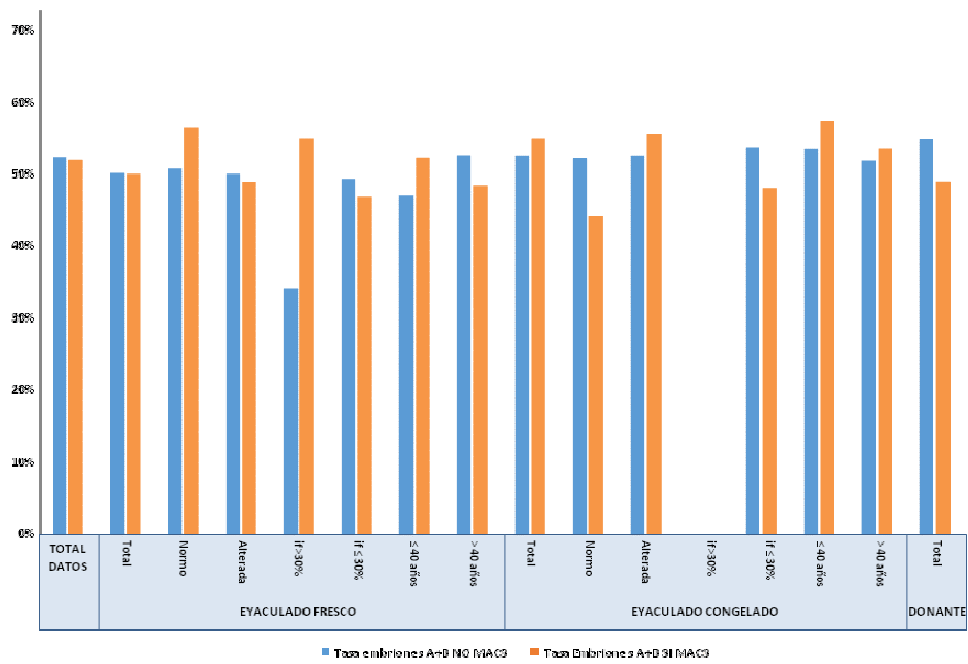
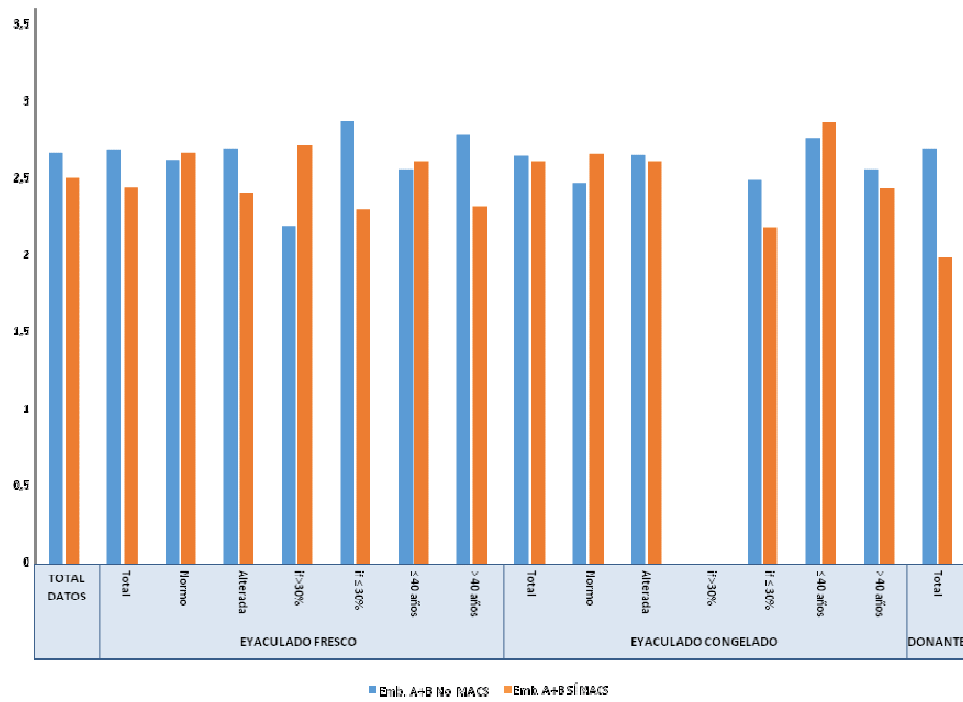
A continuación, visualización de los resultados de los parámetros analizados en este estudio a través de gráficas.

RESULTADOS

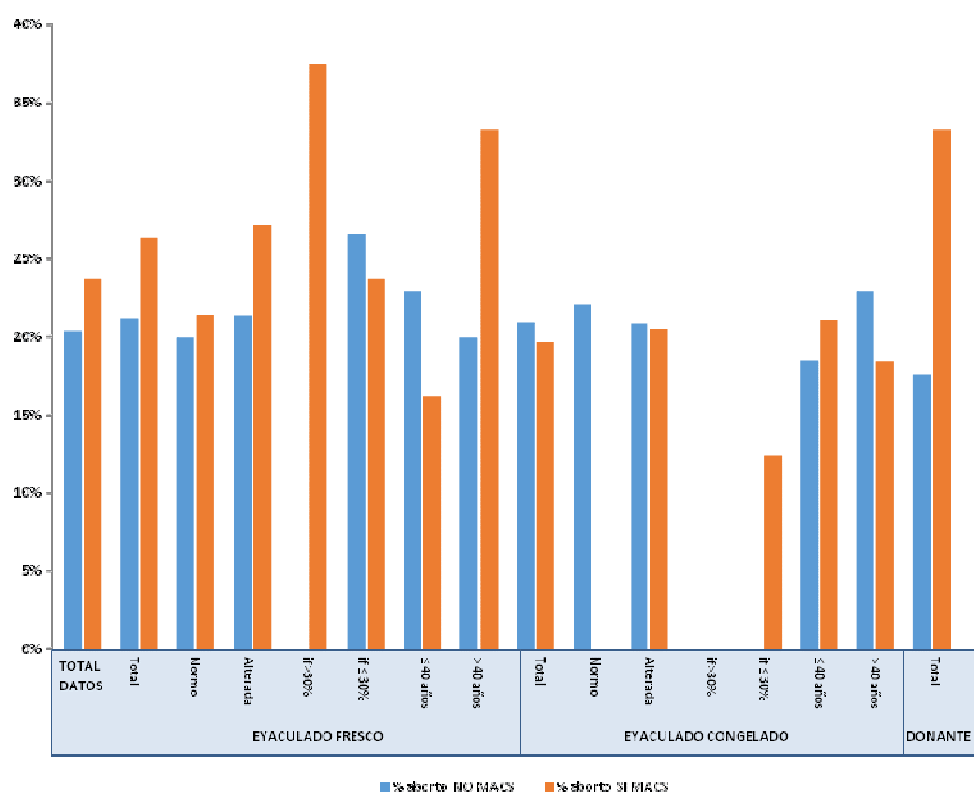
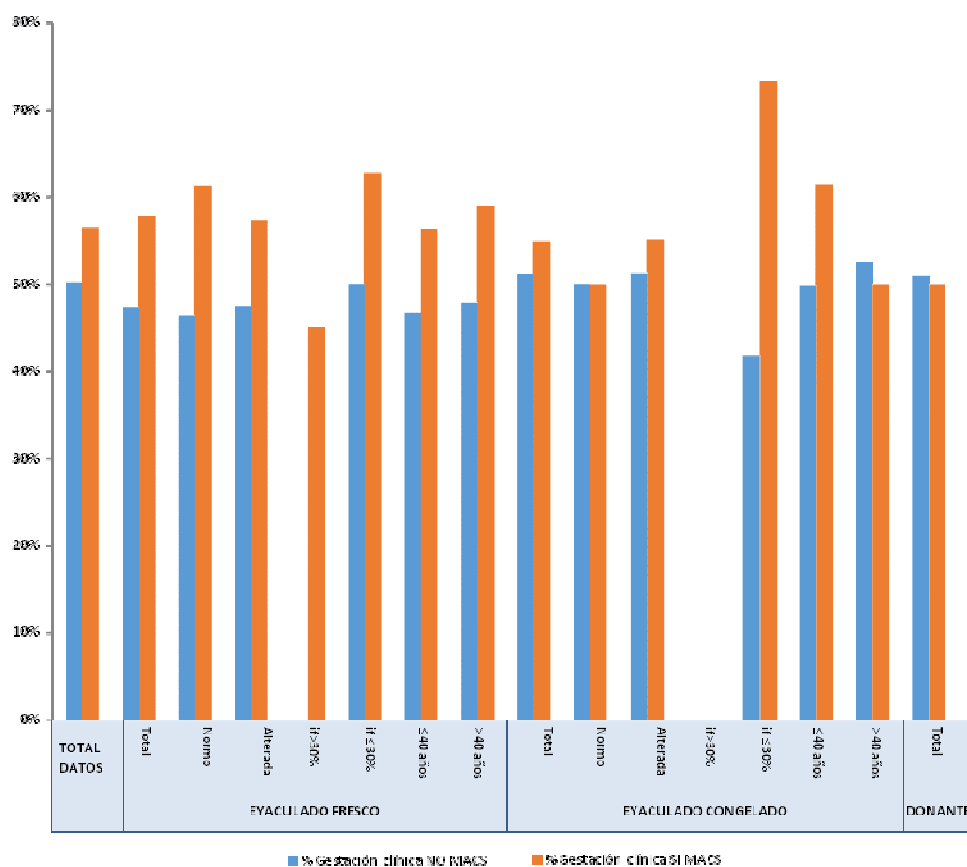
C. Gráficas



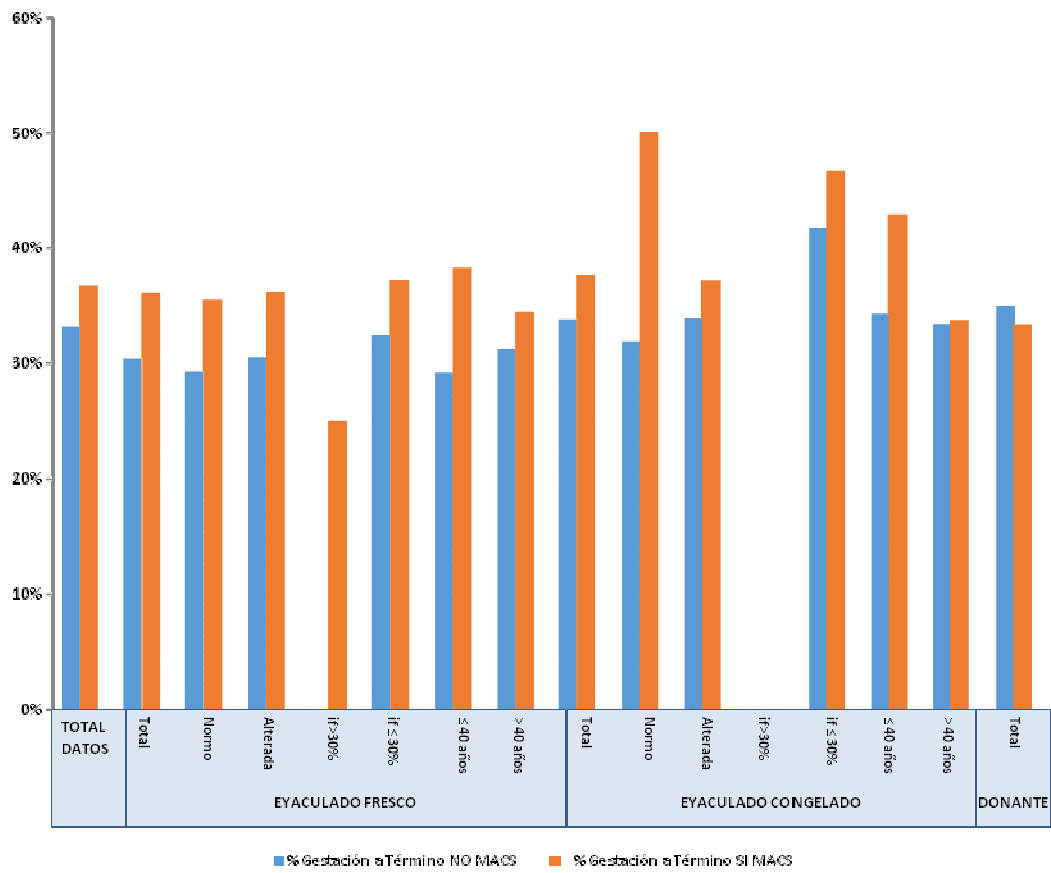
RESULTADOS



RESULTADOS



RESULTADOS



DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

Se ha hablado que el óvulo es el pilar fundamental para dar lugar a un embrión, y que el espermatozoide simplemente podría jugar un papel secundario. Se supone que el óvulo es capaz, con todo su material primario, de corregir el daño que sea necesario para que tenga lugar el desarrollo embrionario [102]. Sin embargo, también se ha documentado que el espermatozoide contiene alrededor de 3.000 tipos diferentes de ARN mensajeros, muchos de los cuáles son los responsables de codificar distintas proteínas necesarias para el desarrollo del embrión [103].

Estos estudios han reforzado las teorías de la existencia de dos efectos paternos en el desarrollo embrionario [104][105]: un efecto paterno temprano implicado en el proceso de post-fecundación, visible en el estadio de pronúcleos, y un efecto tardío, que sin producir alteraciones en la velocidad de desarrollo y morfología embrionaria en estadios tempranos, haría disminuir las posibilidades de gestación.

Este efecto paterno tardío se podría explicar apoyándonos en la hipótesis de que la expresión del material genético paterno podría tener lugar a las 72h postfecundación. Estos daños, por tanto, podrían paralizar la expresión genómica a partir del día +3 postfecundación del embrión [103].

Se ha demostrado que el reparto de óvulos de una misma donante, en mujeres de diferentes edades, no muestra diferencias significativas en cuanto a las posibilidades de gestación [106], es por ello la decisión de hacer este estudio con casos con óvulos de donante, óvulos de buena calidad y de mujeres jóvenes, con el fin de que estos factores ovocitarios que pudieran existir, no condicionaran nuestros resultados y así poder valorar mejor el efecto del gameto masculino en la microinyección con IMSI.

Sabemos, gracias al trabajo que realizamos día a día, que existe una gran cantidad de casos en los que el varón presenta valores en el seminograma muy por encima de lo normal, y que no logra embarazo, y por el contrario, valores por debajo de la normalidad que sí lo consiguen. Por lo que el seminograma, a pesar de ser un estudio básico para orientar la infertilidad masculina, podría tener sus limitaciones.

DISCUSIÓN

El resultado del seminograma podría no representar la calidad morfológica del espermatozoide seleccionado para la microinyección espermática [88][107], incluso en muestras diagnosticadas como normozoospermicas [108].

También encontramos datos que muestran que incluso el espermatozoide de mejor calidad puede tener alteraciones en el ADN, así por ejemplo, se ha documentado como espermatozoides sin defectos morfológicos, pueden afectar a la calidad embrionaria y la probabilidad de embarazo, al relacionarse con la fragmentación del ADN [109].

Todo esto nos lleva a la duda de si los métodos actuales de selección de espermatozoides son inadecuados [110]. Con este estudio, en el cual todos los casos fueron realizados con microscopía IMSI, para minimizar los espermatozoides seleccionados con alteraciones morfológicas, pretendíamos comparar si al realizar una preselección previa, al pasar la muestra espermática por las columnas de Anexina V, podríamos disminuir aquellos espermatozoides apoptóticos y con alteraciones en el ADN espermático y así poder tener mejores resultados en los tratamientos de reproducción asistida a realizar. Es muy importante, por tanto, evaluar todas las muestras espermáticas independientemente de la procedencia, calidad y edad de los pacientes.

En nuestro estudio hemos diferenciado 3 grandes grupos de muestras espermáticas teniendo en cuenta la procedencia de las mismas, muestras espermáticas en fresco de la propia pareja (MF), muestras criopreservadas de la propia pareja (MC) y muestras procedentes del banco de donantes de semen (SD).

Para entender mejor los resultados obtenidos y así poder discutirlos, debemos tener un conocimiento amplio de la muestra poblacional de la que partimos, del total de muestras espermáticas utilizadas en este estudio, el 85,22% de las MF eran OAT y el 96,37% de las MC eran OAT, solo en el caso de las SD no hubo ninguna muestra de calidad OAT lógicamente. Por tanto, en este estudio partimos con muestras de calidades espermáticas muy bajas (excepto en las SD). Si que al ver las calidades espermáticas en los dos grupos de estudio, SI MACS y NO MACS, vemos que los

DISCUSIÓN

porcentajes de muestras N y OAT en los tres tipos de muestra MF, MC y SD son muy similares.

Es importante puntualizar, que más de la mitad de las muestras usadas en el grupo SI MACS eran MF (58,24%), muestras que al estar recién obtenidas deberían tener una fragmentación de ADN espermático menor y por tanto se reduce algo el factor masculino, mientras que más de la mitad de las muestras usadas en el grupo NO MACS eran MC (57,10%) y la congelación de semen se ha asociado con posibles daños en las membranas celulares, así como con alteraciones metabólicas [111], aunque cuando se han seleccionado los mejores espermatozoides para fecundar los óvulos a través de ICSI no se han mostrado diferencias entre los resultados de un ciclo de microinyección, bien sea con semen congelado o fresco [107].

A favor del grupo NO MACS habría que tener en cuenta que aunque más de la mitad de sus muestras fuesen MC, en su grupo, un 17,54% de muestras eran SD frente al grupo SI MACS donde solo un 2,30% de las muestras eran SD, con la ventaja en cuanto a calidad espermática tienen las SD.

Además, habría que puntualizar que en el caso de la utilización de semen de donante en microinyección en nuestro centro, prácticamente las muestras están testadas en un 95% con ciclos de inseminación artificial (IA) previo, y por tanto conocemos su fertilidad previa probada, esto nos llevaría a pensar que el factor masculino en estos casos también podría estar casi eliminado (junto con el ovocitario).

Todo esto nos hace pensar que podrían estar compensadas las calidades espermáticas de los dos grupos de estudio, SI MACS y NO MACS.

En cuanto a la muestra poblacional teniendo en cuenta aquellas muestras a las que previamente al paciente se le realizó un estudio de fragmentación del ADN espermático y tomando como valor de referencia una fragmentación normal, aquella con un índice de fragmentación (IF) menor de 30, vemos que el 81,25% de las muestras con IF>30 están en el grupo SI MACS, ya que la utilización de esta técnica es una indicación en casos de IF elevados y solo el 18,75% de las muestras IF>30 están en el grupo NO MACS.

DISCUSIÓN

De los resultados obtenidos al evaluar la muestra poblacional con estudio realizado de la fragmentación del ADN espermático, es llamativo que un 28,57% de las muestras N en el grupo SI MACS tenía un $IF > 30$, esto quiere decir que muestras aparentemente normales (N), al analizar los parámetros de un seminograma rutinario, como puede ser concentración, velocidad, morfología, puedan tener, sin embargo, alta tasa de ADN espermático fragmentado.

Una vez analizada la situación de partida con un esquema de las muestras utilizadas en este estudio (bien muestras N ó bien muestras OAT) comenzamos a valorar y discutir los resultados de los verdaderos parámetros a analizar en este estudio comparando ambos grupos, cuando se ha realizado la preselección espermática con las columnas de Anexina V antes de la realización de IMSI, SI MACS y cuando no se ha realizado esa preselección espermática previa, antes de llevar a cabo IMSI, NO MACS.

Vemos que si comparamos SI MACS con NO MACS en toda la población de estudio de manera general, sin tener en cuenta otros parámetros, los valores de tasa de fecundación, gestación clínica y gestación a término son mayores en el grupo SI MACS, siendo además significativa la diferencia en la tasa de fecundación ($p=0.039$) y de gestación clínica ($p=0.03$).

Si evaluamos esta comparación en el caso de las muestras en fresco (MF), tenemos igualmente mejores resultados en las tasas de fecundación, gestación clínica y gestación a término en el grupo SI MACS, siendo también además significativa la diferencia en los casos de las tasas de fecundación ($p=0.02$) y de gestación clínica ($p=0.017$) y no siendo significativa la diferencia en el caso de la tasa de gestación a término.

Si además clasificamos estas MF según calidades espermáticas (N y OAT), vemos que los parámetros a estudio tienen mejores resultados en el grupo SI MACS independientemente de las calidades, ya sea en las muestras N como OAT, siendo significativa la diferencia en las tasas de fecundación ($p=0.034$) y gestación clínica ($p=0.038$) en las muestras OAT y no significativa en las muestras de calidad N.

DISCUSIÓN

Si clasificamos las MF por su IF (índice de fragmentación de ADN espermático), aunque la n estudiada es muy pequeña, vemos que hay un mejor resultado con una diferencia significativa ($p=0.028$) en la tasa de fecundación en el grupo SI MACS en aquellos casos con $IF \leq 30$, sin embargo obtenemos una mejor tasa de fecundación en el grupo NO MACS cuando el $IF > 30$, en este último caso la n es muy pequeña y por tanto no es significativa la diferencia. En las tasas de gestación clínica y gestación a término, el resultado, aunque no es significativa su diferencia, es mejor en el grupo SI MACS también.

Si clasificamos estas muestras en fresco (MF) por la edad del paciente, vemos que al igual que en los casos vistos anteriormente, las tasas de fecundación, gestación clínica y gestación a término tienen mejores resultados en el grupo de estudio SI MACS, siendo significativa la diferencia de la tasa de fecundación en los pacientes con edad ≤ 40 años ($p=0.015$) y también significativa la diferencia de la tasa de gestación clínica en los pacientes con edad > 40 años ($p=0.05$), en el caso de la gestación a término aún siendo mayor en el grupo SI MACS en ambos rangos de edades, no se da una diferencia significativa entre ellas.

Cuando usamos MC (muestras criopreservadas de los pacientes) observamos que a nivel general también obtenemos mejores tasas de fecundación, gestación clínica y gestación a término en el grupo SI MACS, siendo además significativa la diferencia en el caso de la tasa de fecundación ($p=0.001$).

Si clasificamos por calidades espermáticas, en muestras N y OAT, vemos que los valores de tasa de fecundación y gestación a término son mejores también en el grupo SI MACS independientemente de si las calidades espermáticas son altas o bajas, siendo significativa la diferencia además en el caso de la tasa de fecundación en muestras OAT ($p=0.002$). En el caso de la gestación clínica, en muestras de calidades OAT, la tasa es mayor en el grupo SI MACS aunque no sea significativa pero en el caso de muestras N, esta tasa de gestación clínica nos sale igual en ambos grupos SI MACS y NO MACS. Habría que tener en cuenta que la n de muestras N en MC es muy baja.

DISCUSIÓN

Si clasificamos estas MC según la edad de los pacientes (≤ 40 años y > 40 años), vemos que tanto la tasa de fecundación como la tasa de gestación a término es mejor en el grupo SI MACS, siendo además significativa la diferencia de los resultados con el grupo NO MACS en el caso de la tasa de fecundación, tanto en pacientes ≤ 40 años ($p=0.047$) y en pacientes > 40 años ($p=0,008$). En el caso de la tasa de gestación clínica, en pacientes ≤ 40 años, es mejor el resultado en el grupo SI MACS pero sin embargo en pacientes > 40 años, es un poco mayor la tasa de gestación clínica en el grupo NO MACS, no siendo significativa la diferencia.

Si hablamos de los resultados obtenidos en los parámetros calculados, como son el número de embriones de calidad A+B en día +3 y la tasa de embriones de calidad A+B en día +3, observamos que en MF, en general y en las muestras OAT, al comparar SI MACS frente a NO MACS, dichos valores son mayores en el grupo NO MACS, mientras que en el grupo de muestras N de las MF, estos valores son mayores en el grupo SI MACS. Podemos pensar, por nuestra experiencia, que en estos casos de muestras N en MF, el promedio del número de ovocitos inseminados era mayor y por tanto haya tenido influencia. En ninguno de los casos la diferencia entre los valores es significativa.

Si calculamos estos parámetros en MF cuando tienen $IF \leq 30$ y cuando tienen $IF > 30$, vemos que el número de embriones de calidad A+B en día +3 y la tasa de estos embriones de calidad A+B en día +3, son mejores en el grupo NO MACS cuando se trata de las muestras con $IF \leq 30$, y mayores estos valores en el grupo SI MACS cuando el $IF > 30$, no siendo significativa la diferencia en ninguno de los casos.

Si estos parámetros los calculamos en las MF clasificando por la edad de los pacientes, obtenemos unos valores mejores del número y de la tasa de embriones de calidad A+B en día +3 en el grupo SI MACS solo en el caso de pacientes con edad ≤ 40 años, no siendo significativa la diferencia. En el grupo NO MACS obtenemos valores mejores cuando los pacientes tienen una edad > 40 años, sin ser tampoco significativa la diferencia de los resultados.

En el caso de las MC, a nivel general, sin tener en cuenta ningún parámetro más, el número de embriones de calidad A+B en día +3 es mayor en el grupo NO

DISCUSIÓN

MACS pero sin embargo la tasa de estos embriones de calidad A+B en día +3 es mayor en el grupo SI MACS, no siendo significativa la diferencia entre ellos, pero si clasificamos las muestras por calidades espermáticas el número de embriones de calidad A+B en día +3 es mayor en el grupo SI MACS cuando las muestras son N y en el grupo NO MACS cuando son OAT y al revés con la tasa de embriones de calidad A+B en día +3, que es mayor en el grupo SI MACS cuando las muestras son OAT y mayor en el grupo NO MACS cuando las muestras son N, no siendo en ninguno de estos casos significativa la diferencia entre los resultados.

Si clasificamos estas muestras criopreservadas (MC), según la edad de los pacientes, el número de embriones de calidad A+B en día +3 es mayor en el grupo SI MACS cuando los pacientes tienen una edad ≤ 40 años y mayor en el grupo NO MACS cuando los pacientes tienen una edad >40 años, en el caso de la tasa de embriones de calidad A+B en día +3, tanto si los pacientes tiene una edad ≤ 40 años o >40 años, el valor es mayor en el grupo de estudio SI MACS, no siendo significativa la diferencia entre los resultados de ambos grupos.

Si hablamos de la tasa de aborto calculada que observamos en los datos obtenidos, en el caso de las MF, ya sea a nivel general como clasificando las muestras por sus calidades espermáticas, la tasa de aborto es menor en el grupo NO MACS, no siendo significativa la diferencia entre los datos.

Clasificando las muestras según su IF, vemos que en los casos con $IF \leq 30$, es menor la tasa de aborto en el grupo SI MACS. En los casos con $IF > 30$, habría que puntualizar que no se tuvo ningún embarazo clínico y por tanto no se puede hallar una tasa de aborto.

Si clasificamos estas MF por edades de los pacientes (≤ 40 años y >40 años), la tasa de aborto fue menor en el caso de pacientes ≤ 40 años, en el grupo SI MACS y se obtuvo una menor tasa de aborto en el grupo NO MACS cuando los pacientes estaban dentro del grupo de edad >40 años, no siendo en ninguno de los casos significativamente diferente los resultados.

Es llamativo ver en nuestros datos como la tasa de aborto es mayor en el grupo SI MACS en las MF cuando los pacientes tienen un $IF > 30$ y tienen una edad por

DISCUSIÓN

encima de los 40 años, circunstancias que justifican indicar la utilización de las columnas de Anexina V (MACS) en cualquier centro de reproducción.

Debemos pensar que en este estudio no hemos tenido en cuenta para nada el factor de receptividad endometrial de la mujer receptora, se supone que los endometrios están preparados, aptos para una implantación embrionaria. Ciertos autores apuntan a que una disminución en la receptividad endometrial disminuye las posibilidades de implantación o generan pérdidas de embriones ya implantados [112][113][114]. Otros autores comentan que la calidad del gameto masculino tiene una posible correlación negativa entre la severidad de la calidad espermática y el aumento de la tasa de abortos espontáneos [115][116].

Análisis realizados directamente en los espermatozoides mediante hibridación in situ con fluorescencia (FISH), revelan que los varones infértiles, a pesar de tener cariotipo en sangre periférica normal (46XY), pueden presentar una mayor tasa de anomalías citogenéticas en sus espermatozoides. Se ha comprobado que estas anomalías se pueden asociar a abortos durante el primer trimestre de gestación [117]. Tendríamos que realizar un estudio con datos de FISH realizados en espermatozoides para poder relacionar que la tasa de aborto no mejore al realizar MACS debido a estas anomalías citogenéticas.

Las alteraciones genéticas en los espermatozoides, como anomalías en la condensación del ADN o la fragmentación, estarían relacionadas con menores tasas de fecundación [118], otros autores relacionan las alteraciones genéticas, como las aneuploidías, con un empeoramiento del movimiento de los espermatozoides y disminución de la concentración espermática [119], este conjunto de alteraciones genéticas en el gameto masculino pasan desapercibidas en el control rutinario y diario de los tratamientos de reproducción asistida si no se amplían y como resultado final podrían disminuir las tasas de gestación y aumentar las tasas de aborto.

En los ciclos en los que se utilizó MC, la tasa de aborto en general, es menor en el grupo SI MACS, incluso si clasificamos por calidades espermáticas, tanto en muestras N como en OAT, también en el grupo SI MACS, aunque en ninguno de los

DISCUSIÓN

casos es significativa la diferencia. Habría que tener en cuenta que la n de las muestras N en MC es muy baja.

Clasificando las muestras espermáticas por los dos rangos de edades visto hasta ahora en nuestro estudio en las MC, observamos que la tasa de aborto es algo menor en el grupo SI MACS cuando se trata de pacientes con edad >40 años y menor esta tasa de aborto en el grupo NO MACS cuando los pacientes tienen ≤ 40 años, no siendo significativa la diferencia entre estos resultados obtenidos.

Hasta aquí hemos valorado o discutido los resultados obtenidos en los casos en los que se ha utilizado MF y MC.

En los ciclos en los que se ha utilizado SD, observamos que en todos los parámetros calculados en este estudio, comparando SI MACS y NO MACS, los resultados de tasa de fecundación, número de embriones de calidad A+B en día +3, tasa de embriones de calidad A+B en día +3 y tasa de embarazo clínico, son mejores en el grupo NO MACS, aunque no siendo significativa la diferencia. Habría que tener en cuenta que la n de este tipo de muestra en el grupo SI MACS es muy baja, ya que no estaría indicada la técnica por ser muestras de muy buena calidad y la mayoría de ellas con fertilidad probada.

Aunque hay publicaciones donde comparan la utilización de las columnas de Anexina V tras el swing up versus solo el swing up, en ciclos de ICSI con óvulos de donantes y no obtienen mejoras en los resultados de nuestros parámetros estudiados [120], vemos que en nuestro estudio realizado, con la combinación: preparación rutinaria de la muestra espermática (Gradientes de densidad) + Columnas de Anexina V (MACS) + IMSI, si obtenemos mejoras en la mayoría de los parámetros de resultados de las TRA analizados.

Si además, por varios estudios previos, sabemos que la utilización de la técnica MACS no tiene ningún efecto secundario negativo hasta ahora, en los niños nacidos [121], creemos que en todos los casos, excepto cuando se utiliza muestra de semen de donante, se debería llevar a cabo esta técnica en la preparación de la muestra espermática rutinaria para mejorar la calidad de los espermatozoides seleccionados para la posterior realización de IMSI a la hora de microinyectar los ovocitos.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

1. De nuestro estudio se obtienen resultados significativamente mejores en las tasas de fecundación y de gestación clínica **en general**, cuando se lleva a cabo la preselección espermática con columnas de Anexina V (MACS) junto con la rutinaria separación de gradientes, antes de la realización de IMSI.
2. En el caso de **muestras en fresco (MF)**, las tasas de fecundación, gestación clínica y gestación a término son mejores en el grupo SI MACS siempre, siendo significativa la diferencia en las tasas de fecundación cuando las muestras son de calidad OAT, cuando tienen menos de 40 años los pacientes o cuando el $IF \leq 30$, siendo significativa la diferencia en las tasas de gestación clínica, en los casos con muestras espermáticas OAT o con muestras de varones de más de 40 años de edad.
3. En el caso de las **muestras congeladas (MC)**, las tasas de fecundación, gestación clínica y gestación a término son mejores siempre si se realiza MACS, siendo significativa la tasa de fecundación en los casos con muestras OAT y en cualquiera de los intervalos de edades estudiados.
4. Acorde a nuestros datos, en el caso de **muestras de semen de donante (SD)**, no vemos indicación de la técnica MACS ya que ninguno de los parámetros estudiados mejora. Son muestras de muy buena calidad, de personas jóvenes y con fertilidad probada previa la mayoría de ellas.
5. Debido a los resultados obtenidos, sería óptimo pensar que la utilización de columnas de Anexina estaría indicada siempre, independientemente de la calidad de las muestras, edad de los pacientes o índice de fragmentación del ADN espermático en todas las muestras en fresco y muestras criopreservadas de la pareja.
6. La separación por columnas de Anexina resulta un sistema simple, flexible, rápido y económico para la selección de espermatozoides no apoptóticos, por lo tanto el coste –beneficio de la realización de MACS es favorable.

CONCLUSIONES

7. Con los resultados obtenidos en este trabajo se demuestra que la aplicación de MACS, tras la realización de la rutinaria separación espermática por gradientes, en los ciclos de fecundación in vitro con IMSI, ayuda a reducir el porcentaje de apoptosis en las muestras espermáticas y se convierte en una herramienta complementaria a los métodos de rutina que mejora las tasas de éxito en las TRA, sobre todo conociendo que su utilización, no tiene efectos secundarios negativos para la descendencia.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

VII. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Relación de abreviaturas que aparecen en texto. En muchos casos se ha conservado la correspondiente abreviatura en inglés debido a su frecuente utilización en el lenguaje científico.

A: astenozoospermicas.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ARN: ácido ribonucleico.

ASEBIR: Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción.

AT: astenoteratozoospermicas.

CCCO: complejos cúmulo-corona-ovocito.

CFTR: gen regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (del inglés *cystic fibrosis transmembrane regulator*).

CO₂: dióxido de carbono.

CP: corpúsculo polar.

CP3: Caspasa-3.

CP8: Caspasa-8.

CP9: Caspasa-9.

DGP: diagnóstico genético preimplantacional.

FasL: Ligando asociado a fibroblastos.

FISH: hibridación in situ de fluorescencia (del inglés *fluorescence in situ hybridization*)

FIV: fecundación *in vitro*.

FSHr: hormona folículo estimulante.

GnRH: hormona liberadora de gonadotropina (del inglés *gonadotropin releasing hormone*).

HBV: virus de la hepatitis B (del inglés *hepatitis B virus*).

HCV: virus de la hepatitis C (del inglés *hepatitis C virus*).

HIV: virus de inmunodeficiencia humano (del inglés *human immunodeficiency virus*).

IA: inseminación artificial.

ICSI: inyección intracitoplasmática de espermatozoides o microinyección espermática (del inglés *intracytoplasmic sperm injection*).

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

IF: índice de fragmentación.

IMSI: inyección intracitoplasmática de espermatozoides seleccionados morfológicamente (del inglés *intracytoplasmic morphologically select sperm injection*).

IVE: interrupción voluntaria del embarazo.

KD: Kilodalton.

LCF: latido cardíaco fetal.

MACS: Selección espermática con columnas de Anexina (del inglés *Magnetic activate cell sorting*).

MC: Muestras de semen criopreservadas de la pareja

MF: Muestras de semen en fresco de la pareja.

mg: miligramo.

MI: metafase I.

MII: metafase II.

ml: mililitro.

mm: milímetro.

millones/mil: millones por mililitro.

MSOME: evaluación de la morfología de los orgánulos de espermatozoides móviles (del inglés *motile sperm organelar morphology examination*)

n: número de casos.

N: normozoospermicas.

N₂: nitrógeno.

nm: nanómetros.

Nº: número.

OA: oligoastenoospermicas.

OAT: oligoastenoteratoospermicas

°C: grados centígrados

OMS: Organización Mundial de la Salud.

p: p-valor o nivel de significación.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (del inglés *polymerase chain reaction*).

pH: “pondus Hydrogenium”.

PI: profase-I o vesícula germinal.

PICSI: ICSI physiological

PN : pronúcleos.

PS: Fosfatidilserina.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

PVP: polyvinylpyrrolidona.

RH: factor Rhesus.

rpm: revoluciones por minuto.

SCD: test de dispersión de la cromatina (del inglés *sperm chromatin dispersión test*).

SCSA: test de dispersión de la cromatina (del inglés *sperm chromatin structure assay*).

SD: Muestras de semen de donante.

SEF: Sociedad Española de Fertilidad.

SG: saco gestacional.

SPSS: Programa estadístico (del inglés statistical package for the social sciences).

T: teratozoospermicas.

TESE: Extracción de espermatozoides del tejido testicular

TRA: técnicas de reproducción asistida.

TUNEL: del inglés TdT-mediated x-dUTP nick end labeling.

UI: unidades internacionales.

β -HCG: subunidad beta de la gonadotropina coriónica humana.

β -HCG +: Gestación clínica

χ^2 : xi cuadrado.

μ l: microlitro.

μ m: micrómetro.

BIBLIOGRAFÍA

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Gonzalez R, Quintana J, Campos I, Magán R, Ballesteros A. Estudio de la mujer estéril. En Remohí J, Bellver J, Domingo J, Bosch E, Pellicer A, editores. *Manual Práctico de Esterilidad y Reproducción Humana*. 3ª ed. Madrid: Mc Graw Hill 2008; 1-9.
2. Ombelet W, Cooke I, Dyer S, Serour G, Devroy P. Infertility and the provision of infertility medical services in developing countries. *Human Reprod Update* 2008; 605-621.
3. Ferraretti AP, Goossens V, Kupka M, Bhattacharya S, Mouzon J de, Castilla JA, et al. Assisted reproductive technology in Europe, 2009: results generated from European registers by ESHRE. *Human Reprod* 2013;det278.
4. Speroff L. The effect of aging on infertility. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 1994; 6: 115-20.
5. Sauer MV. Reproduction at an advanced maternal age and maternal health. *Fertil Steril*. 2015; 103(5):1136-43
6. Garrido N, Meseger M, Simón C, Pellicer A, Remohí J. Patología seminal en las parejas infértiles en un centro de reproducción asistida. X Congreso Nacional de Andrología. *Actualidad Andrológica*. 2002; 9(2-3)56-60.
7. Ombelet W, Deblaere K, Bosmans E, Cox A, Jacobs P, Janssen M, et al. Semen quality and intrauterine insemination. *Reprod BioMed Online* 2003; 7(4):485-492.
8. Henkel RR, Schill W-B. Sperm preparation for ART. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1:108.
9. World Health Organization. *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*. 5th edition.

BIBLIOGRAFÍA

10. Bucar S, Gonçalves A, Rocha E, Barros A et al. DNA fragmentation in human sperm after magnetic-activated cell sorting. *J Assist Reprod Genet.* 2015; 32(1):147–154.
11. Youn JS, Cha SH, Park CW, Yang KM, Kim JY, Koong MK, et al. Predictive value of sperm motility characteristics assessed by computer-assisted sperm analysis in intrauterine insemination with superovulation in couples with unexplained infertility. *Clin Exp Reprod Med* 2011; 38(1):47-52.
12. Santamaría, L., Aspectos bioéticos de las técnicas de reproducción asistida. *Cuadernos de Bioética*, 2000. 1º: p. 37-47. 3.
13. Duran HE, Morshedi M, Kruger T, Oehninger S. Intrauterine insemination: a systematic review on determinants of success. *Hum Reprod Update.* 2002; 8(4):373-384.
14. Panel P, Chansigau JP, de Meeus JB et al. [Intra-uterine artificial insemination. Indications, techniques, results; 83 cases]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris).* 1995; 24(5):496-504.
15. Matorras RH, Hernández J. Estudio y Tratamiento de la Pareja Estéril. 1ª Edición. Madrid Adalia Farma S.L, 2007.
16. W. Ombelet, J. Van Robays. Artificial insemination history: hurdles and milestones. *Facts Views Vis Obgyn.* 2015; 7(2): 137–143.
17. Schenk, S.L. (1880): *Das Säugethierei künstlick befruchtet ausserhalb des Mutterthieres.* Mitt. Embr. Inst. K. K. Univ. Wien.; 1: 107–118.
18. Pincus G, Enzmann EV. Comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro; activation of ovarian eggs. *J Exp Med.* 1935; 31;62(5):665-75.
19. Pincus G, Saunders B. The Comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro.VI. The maturation of human ovarian ova. *The anatomical record*, vol. 75, issue 4, (1939):537-545.

BIBLIOGRAFÍA

20. Shettles LB. *Further observations on living human oocytes in vitro*. *Int J Fertil*. 1981; 26(1):71-73.
21. Edwards RG, Bavister BD, Steptoe PC. *Early stages of fertilization in vitro of human oocytes matured in vitro*. *Nature*. 1969; 15;221(5181):632-635.
22. Steptoe PC, Edwards RG. *Birth after the reimplantation of a human embryo*. *Lancet*. 1978; 12;2(8085):366.
23. Remohí J, Romero JL, Pellicer A, Simón C, Navarro J. *Manual práctico de esterilidad y reproducción humana*. McGraw-Hill Interamericana, Aravaca, Madrid 1999.
24. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. *Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte*. *Lancet*. 1992;340:17-18.
25. Palermo GD, Neri QV, Takeuchi T, Rosenwaks Z. *ICSI: where we have been and where we are going*. *Semin Reprod Med*. 2009; 27(2):191-201
26. Iritani A. *Current status of biotechnological studies in mammalian reproduction*. *Fertil Steril*. 1988; 50(4):543-551.
27. Goto K, Kinoshita A, Takuma Y, Ogawa K. *Fertilisation of bovine oocytes by the injection of immobilised, killed spermatozoa*. *Vet Rec*. 1990; 24;127(21): 517-520.
28. Lo Monte G, Murisier F, Piva I et al. *Focus on intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI): a mini-review*. *Asian J Androl*, 2013; 15(5): 608-615.
29. Loutradi KE et al. *The effects of sperm quality on embryo development after intracytoplasmic sperm injection*. *J Assist Reprod Genet*. 2006; 23(2): 69-74.
30. Bonduelle M, Camus M, De Vos A, et al. *Seven years of intracytoplasmic sperm injection and follow-up of 1987 subsequent children*. *Hum Reprod*. 1999; 14 Suppl 1: 243-264.

BIBLIOGRAFÍA

31. Mahadevan M, Baker G. Assessment and preparation of semen for in vitro fertilization. In: Wood et al (eds), *Clinical In Vitro Fertilization*. ©Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1984. pp. 83–97.
32. Jameel T. Sperm swim-up: a simple and effective technique of semen processing for intrauterine insemination. *J Pak Med Assoc*. 2008; 58(2):71-74.
33. Mortimer D. Sperm preparation techniques and iatrogenic failures of in-vitro fertilization. *Hum Reprod*. 1991; 6(2):173-176.
34. Avendaño C, Franchi A, Taylor S, Morshedi M, Bocca S, Oehninger S. Fragmentation of DNA in morphologically normal human spermatozoa. *Fertil Steril*. 2009; 91(4):1077-1084.
35. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972; 26(4):239-257.
36. Jacobson MD, Weil M, Raff MC. Programmed cell death in animal development. *Cell*. 1997; 7;88(3):347-354.
37. Hannun YA. Apoptosis and the Dilemma of Cancer Chemotherapy. *Blood*. 1997; 15;89(6):1845-1853.
38. Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, et al. Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med*. 1997; 17;336(16):1131-1141.
39. Sinha Hikim AP, Swerdloff RS. Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Rev Reprod*. 1999; 4(1):38-47.
40. Tang D, Kang R, Coyne CB, Zeh HJ, Lotze MT. PAMPs and DAMPs: Signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunol Rev*. 2012; 249(1):158-175.
41. Barroso G, Morshedi M, Oehninger S. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Hum Reprod*. 2000; 15(6):1338-1344.

BIBLIOGRAFÍA

42. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*. 1995; 184(1):39-51.
43. Van Heerde WL, de Groot PG, Reutelingsperger CP. The complexity of the phospholipid binding protein Annexin V. *Thromb Haemost*. 1995; 73(2):172-179.
44. Lizarbe MA, Barrasa JI, Olmo N, et al. Annexin-Phospholipid Interactions. Functional Implications. *Int J Mol Sci*. 2013; 14(2): 2652–2683.
45. Oosterhuis GJ, Mulder AB, Kalsbeek-Batenburg E, Lambalk CB, Schoemaker J, Vermes I. Measuring apoptosis in human spermatozoa: a biological assay for semen quality? *Fertil Steril*. 2000; 74(2):245-250.
46. Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger C. Flow cytometry of apoptotic cell death. *J Immunol Methods*. 2000; 21;243(1–2):167-190.
47. Zhang HB, Lu SM, Ma CY, Wang L, Li X, Chen ZJ. Early apoptotic changes in human spermatozoa and their relationships with conventional semen parameters and sperm DNA fragmentation. *Asian J Androl*. 2008;10(2):227-235.
48. Kroemer G, Petit P, Zamzami N, Vayssière JL, Mignotte B. The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J*. 1995; 9(13):1277-1287.
49. Kroemer G, Zamzami N, Susin SA. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today*. 1997; 18(1):44-51.
50. Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR. Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility. *J Histochem. Cytochem* 1982; 30(3):279-280.

BIBLIOGRAFÍA

51. Flesch FM, Gadella BM. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim. Biophys.* 2000; *Acta* 1469(3):197-235.
52. Glander HJ, Schaller J. Binding of annexin V to plasma membranes of human spermatozoa: a rapid assay for detection of membrane changes after cryostorage. *Mol Hum Reprod.* 1999; 5(2):109-115.
53. Duru NK, Morshedi MS, Schuffner A, Oehninger S. Cryopreservation-Thawing of fractionated human spermatozoa is associated with membrane phosphatidylserine externalization and not DNA fragmentation. *J Androl.* 2001; 22(4):646-651.
54. O'Connell M, McClure N, Lewis SEM. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Hum Reprod.* 2002; 17(3):704-709.
55. Grunewald S, Paasch U, Said TM, Sharma RK, Glander HJ, Agarwal A. Caspase activation in human spermatozoa in response to physiological and pathological stimuli. *Fertil Steril.* 2005; 83(Suppl 1):1106-1112.
56. Said TM, Paasch U, Glander HJ, Agarwal A. Role of caspases in male infertility. *Hum Reprod Update.* 2004; 10(1):39-51.
57. Weng SL, Taylor SL, Morshedi M, Schuffner A, Duran EH, Beebe S, et al. Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm. *Mol Hum Reprod.* 2002; 8(11):984-991.
58. Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem.* 1998; 254(3):439-459.
59. Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science.* 1995; 267(5203):1449-1456.

BIBLIOGRAFÍA

60. Paasch U, Grunewald S, Fitzl G, Glander H-J. Deterioration of Plasma Membrane Is Associated With Activated Caspases in Human Spermatozoa. *J Androl*. 2003; 24(2):246-252.
61. Bajwa N, Liao C, Nikolovska-Coleska Z. Inhibitors of the anti-apoptotic Bcl-2 proteins: a patent review. *Expert Opin Ther Pat*. 2012;22(1):37-55.
62. Oehninger S, Morshedi M, Weng SL, Taylor S, Duran H, Beebe S. Presence and significance of somatic cell apoptosis markers in human ejaculated spermatozoa. *Reprod BioMed Online*. 2003; 7(4):469-476.
63. Seli E, Sakkas D. Spermatozoal nuclear determinants of reproductive outcome: implications for ART. *Hum Reprod Update*. 2005; 11(4):337-349.
64. Aitken RJ. The Amoroso Lecture The human spermatozoon – a cell in crisis? *J Reprod Fertil*. 1999; 115(1):1-7.
65. Aitken RJ, De Iuliis GN. Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reprod BioMed Online*. 2007; 14(6):727-733.
66. Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi N, Bizzaro D. Nature of DNA Damage in Ejaculated Human Spermatozoa and the Possible Involvement of Apoptosis. *Biol Reprod*. 2002; 66(4):1061-1067.
67. Barroso G, Taylor S, Morshedi M, Manzur F, Gaviño F, Oehninger S. Mitochondrial membrane potential integrity and plasma membrane translocation of phosphatidylserine as early apoptotic markers: a comparison of two different sperm subpopulations. *Fertil Steril*. 2006; 85(1):149-154.
68. Carrell DT, Wilcox AL, Lowy L, Peterson CM, Jones KP, Erickson L, et al. Elevated sperm chromosome aneuploidy and apoptosis in patients with unexplained recurrent pregnancy loss. *Obstet Gynecol*. 2003; 101(6):1229-1235.

BIBLIOGRAFÍA

69. Henkel R, Hajimohammad M, Stalf T, Hoogendijk C, Mehnert C, Menkveld R, et al. Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. *Fertil Steril*. 2004; 81(4):965-972.
70. Ramos L, de Boer P, Meuleman EJH, Braat DDM, Wetzels AMM. Chromatin condensation and DNA damage of human epididymal spermatozoa in obstructive azoospermia. *Reprod Biomed Online*. 2004; 8(4):392-397.
71. Ahmadi S, Bashiri R, Ghadiri-Anari A, Nadjarzadeh A. Antioxidant supplements and semen parameters: An evidence based review. *Int J Reprod Biomed (Yazd)*. 2016; 14(12):729-736.
72. Said T, Agarwal A, Grunewald S, Rasch M, Baumann T, Kriegel C, et al. Selection of nonapoptotic spermatozoa as a new tool for enhancing assisted reproduction outcomes: an in vitro model. *Biol Reprod*. 2006; 74(3):530-537.
73. Said TM, Grunewald S, Paasch U, Glander HJ, Baumann T, Kriegel C, et al. Advantage of combining magnetic cell separation with sperm preparation techniques. *Reprod Biomed Online*. 2005; 10(6):740-746.
74. Dirican EK, Ozgun OD, Akarsu S, Akin KO, Ercan O, Ugurlu M, et al. Clinical outcome of magnetic activated cell sorting of non-apoptotic spermatozoa before density gradient centrifugation for assisted reproduction. *J Assist Reprod Genet*. 2008; 25(8):375-381.
75. Miltenyi S, Müller W, Weichel W, Radbruch A. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry*. 1990; 11(2):231-238.
76. Paasch U, Grunewald S, Agarwal A, Glandera HJ. Activation pattern of caspases in human spermatozoa. *Fertil Steril*. 2004; 81(Suppl 1):802-809.
77. Said TM, Agarwal A, Zborowski M, Grunewald S, Glander HJ, Paasch U. Utility of magnetic cell separation as a molecular sperm preparation technique. *J Androl*. 2008; 29(2):134-142.

BIBLIOGRAFÍA

78. Lee TH, Liu CH, Shih YT, Tsao HM, Huang CC, Chen HH, et al. Magnetic-activated cell sorting for sperm preparation reduces spermatozoa with apoptotic markers and improves the acrosome reaction in couples with unexplained infertility. *Hum Reprod.* 2010; 25(4):839-846.
79. Tavalae M, Deemeh MR, Arbabian M, Nasr-Esfahani MH. Density gradient centrifugation before or after magnetic-activated cell sorting: which technique is more useful for clinical sperm selection? *J Assist Reprod Genet.* 2012; 29(1):31-38.
80. De Vantéry Arrighi C, Lucas H, Chardonens D, de Agostini A. Removal of spermatozoa with externalized phosphatidylserine from sperm preparation in human assisted medical procreation: effects on viability, motility and mitochondrial membrane potential. *Reprod Biol Endocrinol.* 2009; 7:1.
81. Mortimer ST, Swan MA, Mortimer D. Effect of seminal plasma on capacitation and hyperactivation in human spermatozoa. *Hum Reprod.* 1998; 13:2139-2146.
82. Cortés-Gutiérrez EI, Dávila-Rodríguez MI, López-Fernández C, Fernández JL, Gosálvez J. Evaluación en el daño del DNA espermático. *Actas Urol. Esp* 2007; 31(2):120-131.
83. Fernández, JL, Muriel L, Rivero, MT, Goyanes V, Vazquez R, Alvarez JG. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J androl.* 2003; 24(1):59-66.
84. Fernández JL, Muriel L, Goyane, V, Segrelles E, Gosálvez J, et al. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril.* 2005; 84(4):833-842.
85. Veeck L. Evaluación de ovocitos y preembriones en el laboratorio FIV. En: Remohi J, Pellicer A, Bonilla-Musoles F, editores. *Avances en Reproducción Asistida.* Madrid: Ediciones Díaz de Santos S.A. 1992; 117-162.

BIBLIOGRAFÍA

86. Harris SJ, Milligan MP, Masson GM, Dennis KJ. Improved separation of motile sperm in asthenospermia and its application to artificial insemination homologous (AIH). *Fertil Steril*. 1981; 36(2):219-21.
87. Gorus FK, Pipellers DG. A rapid method for the fraction of human spermatozoa according to their progressive motility. *Fertil Steril*. 1981; 35:662-667.
88. Bartoov, B., et al., Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome. *J Androl*. 2002; 23(1): 1-8.
89. Van de Velde H, de Vos A, Joris H, Nagy ZP, Steirteghem AC. Effect of timing of oocyte denudation and micro-injection on survival, fertilization and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. 1998; 13(11):3160-3164.
90. Palermo GP, Schlegel P, Colombo L, et al. Agressive sperm immobilization prior to intracytoplasmatic spermatozoa improves fertilization and pregnancy rates. *Hum Reprod*. 1996; 11(5):1023-1029.
91. Evans JP, Florman HM. The state of the union: The cell biology of fertilization. *Nat Cell Biol*. 2002 Oct;4 Suppl:s57-63.
92. Payne D, Flaherty SP, Barry MF, Matthews CD. Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Human Reprod*. 1997; 12(3):532-541.
93. Capmany G, Taylor A, Braude PR, Bolton VN. The timing of pronuclear formation, DNA synthesis and cleavage in the human 1-cell embryo. *Mol Human Reprod*. 1996; 2(5):299-306.
94. Gamiz P, Rubio C, de los Santos MJ et al. The effect of pronuclear morphology on early development and chromosomal anormalities in cleavage stage embryos. *Hum reprod*. 2003; 18 (11):2413-2419.

BIBLIOGRAFÍA

95. Scott LA, Smith S. *The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval. Human Reprod.* 1998; 13(4): 1003-1013.
96. Maansour RT, Aboulghar MA. *Optimizing the embryo transfer technique. Human Reprod.* 2002; 17(5):1149-1153.
97. Karande V, Morris R, Chapman C. *Impact of the "Physian Factor" on pregnancy rates in a large assisted reproductive technology program: do too many cooks spoil the broth? Fertil Steril.* 1999; 71:1001-1009.
98. Kan AK, Abdalla HI, Gafar AH et al. *Embryo transfer: ultrasound-guided versus clinical touch. Hum Reprod.* 1999; 14:1259-1266.
99. Coroleu B, Carreras O, Veiga A et al. *Embryo transfer under ultrasound guidance improves pregnancy rates in in-vitro fertilization. Hum Reprod.* 2000; 15:616-620.
100. Ghazzawi IM, Al-Hasani S, Karaki R, Souso S. *Transfer Technique and catheter choice influence the incidence of transcervical embryo expulsion and the outcome of IVF. Hum Reprod.* 1999; 14(3):677-682.
101. Sallam HN, Sadek SS. *Ultrasound-guided embryo transfer: a meta-analysis of randomized controlled trials. Fertil Steril.* 2003; 80(4):1042-1046.
102. Krawetz SA. *Paternal contribution: new insights and future challenges. Nat Rev Genet,* 2005; 6(8):633-642.
103. Vanderzwalmen P, Hiemer A, et al. *Blastocyst development after sperm selection at high magnification is associated with size and number of nuclear vacuoles. Reprod Biomed Online.* 2008. 17(5):617-627.
104. Tesarik J. *Paternal effects on cell division in the human preimplantation embryo. Reprod Biomed Online.* 2005; 10(3):370-375.
105. Tesarik J, Greco E, Mendoza C. *Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. Hum Reprod.* 2004; 19(3):611-615.

BIBLIOGRAFÍA

106. Abdalla HI, Burton G, Kirkland A et al. Age, pregnancy and miscarriage: uterine versus ovarian factors. *Hum Reprod*. 1993; 8(9):1512-1517.
107. De Vos A, Van de Velde H, Joris H et al., Influence of individual sperm morphology on fertilization, embryo morphology, and pregnancy outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*. 2003; 79(1):42-48.
108. Wilding M, Coppola G, di Mateo L et al. Intracytoplasmic injection of morphologically selected spermatozoa (IMSI) improves outcome after assisted reproduction by deselecting physiologically poor quality spermatozoa. *J Assist Reprod Genet*. 2011; 28(3):253-262.
109. Mangiarini A, Paffoni A, Restelli L et al. Specific sperm defects are differentially correlated with DNA fragmentation in both normozoospermic and teratozoospermic subjects. *Andrology*. 2013; 1(6):838-844.
110. Said TM, Land JA. Effects of advanced selection methods on sperm quality and ART outcome: a systematic review. *Hum Reprod Update*. 2011; 17(6):719-733.
111. Kopeika J, Thornhill A, Khalaf Y. The effect of cryopreservation on the genome of gametes and embryos: principles of cryobiology and critical appraisal of the evidence. *Hum Reprod Update*. 2015; 21(2):209-227.
112. Meldrum DR. Female reproductive aging--ovarian and uterine factors. *Fertil Steril*. 1993; 59(1):1-5.
113. De Ziegler D. Quality of endometrial preparation. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*. 2008; 37 Suppl 1:S30-3.
114. Navot D, Bergh PA, Williams MA, Garrisi GJ, Guzman I, Sandler B et al. Poor oocyte quality rather than implantation failure as a cause of age-related decline in female fertility. *Lancet*. 1991; 8;337(8754):1375-7.
115. Lin MH, Kuo-Kuang Lee R, Li SH, Lu CH, Sun FJ, Hwu YM. Sperm chromatin structure assay parameters are not related to fertilization rates, embryo

BIBLIOGRAFÍA

- quality, and pregnancy rates in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection, but might be related to spontaneous abortion rates. *Fertil Steril*. 2008; 90(2):352-9.
116. Zorn B, Auger J, Velikonja V, Kolbezen M, Meden-Vrtovec HP. Psychological factors in male partners of infertile couples: relationship with semen quality and early miscarriage. *Int J Androl*. 2008; 31(6):557-64.
117. Al-Hassan S, Hellani A, Al-Shahrani A, Al-Deery M et al. Sperm chromosomal abnormalities in patients with unexplained recurrent abortions. *Arch Androl*. 2005; 51(1):69-76.
118. Benchaib M, Lornage J, Mazoyer C, Lejeune H, Salle B, François Guerin J. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as a prognostic indicator of assisted reproductive technology outcome. *Fertil Steril*. 2007; 87(1):93-100.
119. Collodel G, Capitani S, Baccetti B, Pammolli A, Moretti E. Sperm aneuploidies and low progressive motility. *Hum Reprod*. 2007; 22(7):1893-8.
120. Romany L, Garrido N, Motato Y, Aparicio B, Remohí J, Meseguer M. Removal of annexin V-positive sperm cells for intracytoplasmic sperm injection in ovum donation cycles does not improve reproductive outcome: a controlled and randomized trial in unselected males. *Fertil Steril*. 2014;102(6):1567-75
121. Romany L, Garrido N, Cobo A, Aparicio-Ruiz B, Serra V, Meseguer M. Obstetric and perinatal outcome of babies born from sperm selected by MACS from a randomized controlled trial. *J Assist Reprod Genet*. 2017; 34(2):201-207.